

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

MOLEKULARBIOLOGISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE
CHARAKTERISIERUNG ALTERNATIVER SPLICING-VARIANTEN DES
METHOTREXAT-CARRIERS (RFC)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Stephanie Schrader

aus Hamburg

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Walther Honscha

Gutachter: Prof. Dr. Walther Honscha
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 15, 04103 Leipzig

Prof. Dr. Hermann Müller
Institut für Virologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 29, 04103 Leipzig

Prof. Dr. Ernst Petzinger
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Frankfurter Straße 107, 35392 Gießen

Tag der Verteidigung: 16.12.2008

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Prinzipien der Chemotherapie in der Veterinärmedizin.....	3
2.2	Methotrexat.....	4
2.2.1	Struktur und Wirkungsmechanismus.....	4
2.2.2	Chemotherapeutischer Einsatz und Nebenwirkungen von Methotrexat.....	4
2.2.3	Pharmakokinetik und Membrantransport von Methotrexat.....	6
2.2.4	Resistenzmechanismen gegenüber Methotrexat.....	7
2.3	Reduced Folate Carrier/ Reduced folate carrier (RFC/ Rfc) Methotrexat-Carrier der Ratte (MTX-Carrier).....	9
2.3.1	Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines Transport- systems für reduzierte Folate und MTX und dessen Gewebs- expression.....	9
2.3.2	Analyse der Topologie des RFC/(Rfc) und Homologievergleich zwischen den Spezies.....	11
2.3.3	Identifizierung funktionell bedeutsamer Aminosäuren und Strukturen des RFC/Rfc.....	12
2.4	Alternatives Spleißen (Splicing).....	14
2.5	Genomische Organisation und mögliche Splicing-Varianten des RFC/Rfc und des MTX-Carriers.....	17
2.5.1	hRFC.....	17
2.5.2	mRfc.....	19
2.5.3	haRfc.....	19
2.5.4	MTX-Carrier der Ratte (rRfc).....	19
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	
3.1	Material.....	22
3.1.1	Chemikalien.....	22

3.1.2	Geräte.....	23
3.1.3	Materialien für die Molekularbiologie.....	24
3.1.4	Materialien für die Zellkultur.....	27
3.1.5	Puffer und Lösungen.....	28
3.1.6	Kulturmedien.....	30
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
3.2.1.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe.....	32
3.2.1.3	Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA.....	33
3.2.1.4	Reverse Transkription (RT).....	33
3.2.1.5	Isolation von Plasmid-DNA.....	34
3.2.1.5.1	Mini-Präparation zur Restriktionanalyse.....	34
3.2.1.5.2	Mini-Präparation zur Sequenzierung.....	35
3.2.1.5.3	Midi-Präparation für Transfektionszwecke.....	35
3.2.1.6	DNA-Restriktion.....	36
3.2.1.7	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	37
3.2.1.8.1	RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends-PCR).....	38
3.2.1.9	Sequenzanalyse und Vorhersage von Proteinstrukturen.....	40
3.2.1.10	Klonierung.....	40
3.2.1.10.1	Ligation.....	40
3.2.1.10.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	41
3.2.1.10.3	Transformation kompetenter Zellen.....	42
3.2.1.11	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	42
3.2.1.12	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	43
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	43
3.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.2.2.2	Nachweis von Proteinen im Western Blot.....	44
3.2.2.3	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Lowry.....	45
3.2.3	Zellkulturmethoden.....	45
3.2.3.1	Kultivierung.....	45
3.2.3.2	Überprüfung der Zellvitalität mit Trypanblau.....	46

3.2.3.3	Kryokonservierung.....	46
3.2.3.4	Transfektion von Zelllinien.....	46
3.2.3.4.1	Stabile Transfektion mittels PEI.....	46
3.2.3.4.2	Selektion stabiler Einzelklone.....	47
3.2.3.4.3	Transiente Transfektion	47
3.2.3.5	Indirekte Immunfluoreszenz.....	48
3.2.3.6	Messung der Aufnahme von ³ [H]-Methotrexat.....	48
4	ERGEBNISSE.....	50
4.1	Molekularbiologische Charakterisierung alternativer Splicing-Varianten des RK-MTX.....	50
4.1.1	Nachweis, Klonierung und Sequenzierung neuer cDNA Fragmente.....	50
4.1.2	Erstellung des full-length Klones RK-MTX-2.....	57
4.1.3	Erstellung der full-length Klone RK-MTX-5 und RK-MTX-6.....	60
4.1.4	Genomische Organisation des MTX-Gens.....	62
4.1.5	Vorhersage der Proteinstrukturen.....	63
4.2	Funktionelle Charakterisierung des RK-MTX-2.....	66
4.2.1	Konstruktion der Expressionsvektoren.....	66
4.2.1.1	pIRES-RK-MTX-2.....	66
4.2.1.2	pCR3.1-MTX-2-HA.....	67
4.2.2	Transportaktivität des RK-MTX-2 in stabil transfizierten MDCK- Zellen.....	69
4.2.2.1	Stabile Transfektion von MDCK-Zellen mit pIRES-RK-MTX-2.....	69
4.2.2.2	Aufnahme von ³ [H]-Methotrexat in RK-MTX-2 Transfektanten.....	70
4.2.3	Expression und Lokalisation von MTX-2-HA in stabil transfizierten MDCK-Zellen.....	70
4.3	Expression und Lokalisation der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 als GFP-Fusionsproteine.....	74
4.3.1	Klonierung der GFP-MTX Konstrukte.....	74
4.3.1.1	GFP-MTX-2.....	74
4.3.1.2	GFP-MTX-1.....	75
4.3.1.3	GFP-MTX-5 und GFP-MTX-6.....	76
4.3.2	Transiente Transfektion von MDCK, COS-1 und HPCT Zellen.....	79

4.3.3	Stabile Transfektion von COS-1 und MDCK Zellen.....	82
5	DISKUSSION.....	84
5.1	Molekularbiologische Charakterisierung alternativer Splicing-Varianten des MTX-Carriers (rRfc) unter Berücksichtigung methodischer Aspekte und Aufklärung der genomischen Organisation des MTX-Gens (slc19a1).....	84
5.1.1	RK-MTX-2.....	85
5.1.2	RK-MTX-3 und RK-MTX-4.....	86
5.1.3	RK-MTX-5 und RK-MTX-6.....	87
5.1.4	Genomische Organisation des MTX-Gens der Ratte und Identifizierung der Splicing-Varianten RL-/RK-MTX-1, RL-/RK- MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6.....	90
5.1.4.1	RL-MTX und RK-MTX (-1, -2).....	90
5.1.4.2	RL/RK-MTX-2.....	92
5.1.4.3	RK-MTX-5 und RK-MTX-6.....	93
5.2	Zellbiologische Charakterisierung der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6.....	95
5.2.1	Funktionelle Untersuchungen zur Transportaktivität des RK-MTX-2.....	96
5.2.2	Analyse der GFP-Fusionsproteine der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX- 5 und RK-MTX-6.....	98
5.2.2.1	Subzelluläre Lokalisation der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX- 5 und RK-MTX-6.....	98
5.2.2.2	Die Splicing-Varianten RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6 werden nicht stabil exprimiert und sind mögliche Substrate für den sog. „Nonsense Mediated Decay (NMD)“.....	100
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
7	SUMMARY.....	107
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	109
9	ANHÄNGE.....	125
10	DANKSAGUNG.....	136

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Genomische Organisation des MTX-Gens

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Strukturformel von Methotrexat (MTX, Amethopterin, 4-Amino-N-methylpteroylglutaminsäure)
- Abb. 2: Modell des MTX-Carriers/Rfc der Ratte nach HONSCHA et al. (2000)
- Abb. 3: Formen des alternativen Spleißens
- Abb. 4: Amplifikation von Fragmenten möglicher Splicing-Varianten des RK-MTX
- Abb. 5: Restriktionsfragmente verschiedener Klone von Fragment 3
- Abb. 6: PCR-Analyse von Fragment 3
- Abb. 7: Nested-PCR mit den Fragmenten der Größe von ~850 und ~1400 bp
- Abb. 8: Sequenzvergleich der cDNA-Varianten RK-MTX-1, -MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6
- Abb. 9: Amplifikation des 5'-Fragments des RK-MTX-2
- Abb. 10: Amplifikation des 3'-RACE Fragments des RK-MTX-2
- Abb. 11: Klonierungsstrategie zur Erstellung des Full-length Klon RK-MTX-2
- Abb. 12: Überprüfung der Spezifität der Primer MTX-5-1042R und MTX-6-1158R
- Abb. 13: Genomische Organisation des MTX-Gens und seine alternativen mRNA-Transkripte in Leber und Niere
- Abb. 14: Prediktion der Translationsprodukte der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6
- Abb. 15: Klonierungsschema zur Erstellung des Expressionsvektors pIRES-RK-MTX-2
- Abb. 16: Klonierungsschema zur Erstellung des pCR3.1-MTX-2-HA
- Abb. 17: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2 in den stabil transfizierten MDCK-Zellklonen
- Abb. 18: ³[H]-MTX-Aufnahme in transfizierten MDCK-MTX-2-, MDCK-MTX-1- und untransfizierten MDCK-Zellen
- Abb. 19: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2-HA in stabil transfizierten MDCK-Zellklonen und in MDCK-T2 subklonierten Zellklonen
- Abb. 20: Westernblot-Analyse der stabil transfizierten Zelllinien MDCK2-19 (MTX-1-HA) und MDCK T2-6 (MTX-2-HA)
- Abb. 21: Klonierungsschema zur Erstellung des pEGFP-RK-MTX-2
- Abb. 22: Klonierungsstrategie zur Erstellung des pEGFP-RK-MTX-1
- Abb. 23: Klonierungsstrategie zur Erstellung der Expressionsvektoren pEGFP-RK-MTX-5 und pEGFP-RK-MTX-6

-
- Abb. 24: Nachweis der endogenen mRNA Expression des MTX-1 in HPCT-1E3 Zellen
- Abb. 25: Expression und subzelluläre Lokalisation der GFP-MTX-Varianten in HPCT-1E3 und MDCK über 24 h und 48 h
- Abb. 26: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 in stabil transfizierten COS-1 Zellen
- Abb. 27: Mögliche Ursachen der fehlenden Spezifität der Primer MTX-5-1042R bzw. MTX-6-1158R
- Abb. 28: Vergleich der genomischen Organisation des Gens *slc19a1*/SLC19A1 von Ratte, Maus, Hamster und Mensch

ABKÜRZUNGEN

ALS	Alkaline lysis solution
Abb.	Abbildung
AhR/ArNT	Aryhydrocarbon/Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AP1	Adaptorprimer 1
AP2	Aktivatorprotein 2
AS	Aminosäure
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
BGH	Bovine Growth Hormone
BSA	Bovines Serum Albumin
bZIP	Basic Region Leucin Zipper
5-CH ₃ -THF	Methyltetrahydrofolat
5-CHO-THF	Formyltetrahydrofolat
cpm	counts per minute
Ci	Curie
C/EBP	CAAT/Enhancer Binding Protein
CIP	Calf Intestinale Alkaline Phosphatase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G418	Genitacin
GITC	Guanidinisothiocyanat
HA	Hämagglutinin
HPCT	Hepatocytoma
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
MDCK	Mardin Darby Canine Kidney
MEM	Modified Eagle Medium
Mtx	Methotrexat
NEAA	Non Essential Amino Acids
NMD	Nonsense Mediated Decay
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophrese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PTC	Premature Termination Codon
OD	Optische Dichte
RK	Rat kidney
RL	Rat liver
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SP1	Simian virus 40 Promoterfaktor 1
taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris Buffered Saline Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSS	Transformation and Storage Solution
U	Unit
USF	Upstream Sequence Binding Factor
UV	Ultraviolett
V _{max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid

1 EINLEITUNG

Die Onkologie hat in den letzten Jahren in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen. Neben der höheren Lebenserwartung der Haustiere und damit einhergehenden steigenden Inzidenz der neoplastischen Erkrankungen (SCHNEIDER 1976, WITHROW 1996), ist dies u.a. auch dem Fortschritt in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen in der Veterinärmedizin geschuldet.

Abhängig von Art, Ausmaß und Stadium der Tumorerkrankung werden therapeutisch, neben der Chirurgie und Strahlentherapie, zunehmend Chemotherapeutika eingesetzt.

Das Ziel der Chemotherapie ist nur in Ausnahmen die Heilung des Patienten. Vielmehr stehen in der Veterinärmedizin die Lebensverlängerung bei guter Lebensqualität oder eine Verbesserung der Lebensqualität ohne Verlängerung des Lebens (Palliation) im Vordergrund (KESSLER 1996).

Das Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX) wurde erstmalig 1949 in der Humanmedizin eingesetzt. Es gehört als Folsäureantagonist zur Gruppe der sog. „Antimetabolite“ und wird meist in Kombinationsprotokollen mit anderen Zytostatika eingesetzt. Das Anwendungsgebiet von MTX umfasst neben neoplastischen Erkrankungen auch andere mit Zellproliferation einhergehende Erkrankungen wie z.B. rheumatoide Formen der Arthritis (STAMP et al. 2006). In der Veterinärmedizin stellen die feline Leukose, Lymphosarkome (MACEWEN et al. 1987, MALIK et al. 2001), Osteosarkome (COTTER u. PARKER 1978), der transmissible venerische Tumor (ROGERS 1997) und Mammatumore (RILEY et al. 1982) die Hauptindikationen für die Anwendung von MTX dar. Die Nebenwirkungen von MTX resultieren v.a. in der Schädigung von Geweben mit hoher Proliferationsrate. Des weiteren kommt es bei längerer Anwendung von Zytostatika häufig zu einer Resistenzentwicklung der Tumorzellen.

Die Aufnahme und Elimination von MTX erfolgt konzentrationsabhängig durch verschiedene Transportproteine (MATHERLY u. GOLDMAN 2003), wobei die MTX-Aufnahme vorwiegend über den Reduced Folate Carrier (RFC/ Rfc; SLC19A1/ Slc19a1) vermittelt wird (DIXON et al. 1994, WILLIAMS et al. 1994, MOSCOW et al. 1995).

An frisch isolierten Rattenhepatozyten konnte ein aktives Transportsystem für MTX nachgewiesen werden, das sich durch ein enges Substratspektrum und die Natrium-abhängige Aufnahme des Chemotherapeutikums auszeichnete (HONSCHA u. PETZINGER 1999). Dabei führte die Natriumabhängigkeit der MTX-Aufnahme zunächst zu der Annahme, dass

dieses als Methotrexat-Carrier (MTX-Carrier) bezeichnete Transportsystem von dem humanen RFC funktionell differiert, der als Natrium-unabhängig beschrieben wurde (SIERRA et al. 1995). In weiterführenden Studien konnte jedoch die Orthologie des MTX-Carriers der Ratte mit dem humanen RFC nachgewiesen werden (KNEUER u. HONSCHA 2004).

Die full-length cDNAs des MTX-Carriers wurden aus Leber und Niere der Ratte isoliert und die Proteine funktionell charakterisiert (HONSCHA et al. 2000; KNEUER u. HONSCHA 2004, KNEUER et al. 2004). Während die cDNAs der MTX-Carrier aus Leber und Niere im codierenden Sequenzbereich identisch waren und für ein Protein bestehend aus 512 Aminosäuren codierten, wiesen die cDNAs im 5'-untranslatierten Bereich unterschiedliche Sequenzen auf.

Aus der Leber wurde zudem eine cDNA Variante des MTX-Carriers isoliert, die sich im Sequenzvergleich mit der cDNA des MTX-Carriers durch eine Insertion von 203 bp auszeichnete und als MTX-2 bezeichnet wurde (HONSCHA et al. 2000).

Möglicherweise erklärt sich die Varianz im 5'-untranslatierten Bereich des MTX-Carriers aus Leber und Niere sowie die Variante MTX-2 durch den Vorgang des alternativen Spleißens.

Alternatives Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus, verschiedene Proteine aus einem Gen zu generieren. Dies erklärt die wesentlich höhere Vielfalt der Proteome bei einer relativ geringen Anzahl von Genen in den Genomen verschiedener Organismen (GRAVELEY 2001). Während in den letzten Jahren zwar zunehmend alternativ gespleißte Transkripte entdeckt wurden, wurden nur verhältnismäßig wenige dieser Transkripte weiterführend charakterisiert.

In dieser Arbeit soll daher die Variante MTX-2 auch in der Niere nachgewiesen und sowohl molekularbiologisch als auch hinsichtlich einer eigenständigen, akzessorischen oder regulatorischen Funktion charakterisiert werden. Ferner gilt das Interesse der Detektion weiterer Varianten des MTX-Carriers. Dies dient dem Ziel, weiterführende Erkenntnisse über die genomische Struktur des MTX-Carriers zu erhalten, sowie funktionell möglicherweise bisher nicht beleuchtete Aspekte der MTX-Aufnahme zu untersuchen, die auf alternative Splicing-Varianten des MTX-Carriers zurückzuführen sind.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Prinzipien der Chemotherapie in der Veterinärmedizin

Die Chemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der Tumorthherapie beim Kleintier und wird entweder als primäre Therapie oder in Kombination mit anderen Therapieformen wie chirurgischen Maßnahmen oder der Bestrahlung durchgeführt. Die systemische Wirkung der Chemotherapeutika findet im Gegensatz zum kurativen Einsatz in der Humanmedizin vorwiegend in der palliativen Therapie Anwendung, bei der eine Heilung in der Regel nicht erreicht wird (KESSLER 1999).

Zytostatika wirken hemmend auf die Zellteilung, wobei sich Tumorzellen nahezu ständig in einer Phase der Zellteilung befinden, während sich die meisten Zellen normalen Gewebes in der Ruhephase G₀- bzw. G₁-Phase befinden. Auf Grundlage ihrer Wirkungsweise werden Zytostatika in verschiedene Klassen und zusätzlich in phasenspezifische und phasenunspezifische Therapeutika eingeteilt (MUTSCHLER 1997). Phasenunabhängig wirken Alkylantien (z.B. Chlorambucil, Cisplatin), Interkalantien (z.B. Bleomycin, Doxorubicin) und Glukokortikoide (Prednisolon). In der Phase der DNA-Synthese (S-Phase) wirken die sog. „Antimetabolite“ (z.B. Methotrexat, Cytarabin, Fluorouracil) und in der Mitose-Phase sog. „Spindelgifte“ wie z.B. Vincristin und Vinblastin.

Auf Grundlage ihrer verschiedenen Wirkungsmechanismen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus werden Zytostatika in Kombinationsprotokollen eingesetzt. Durch die Ausnutzung synergistischer Effekte wird die systemische Wirksamkeit erhöht und das Risiko einer Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen ein Chemotherapeutikum verringert (KESSLER 1999).

Der limitierende Faktor einer Chemotherapie liegt in den unerwünschten Nebenwirkungen der verwendeten Arzneimittel. Die Hemmung der Zellteilung betrifft zwangsläufig auch das physiologisch schnell proliferierende Gewebe. Davon betroffen sind das hämatopoetische System, das Epithel der Schleimhäute, die Haut und deren Anhangsgebilde und das Keimepithel (KROKER 1997). Zur Regeneration der Zellen bedarf es daher behandlungsfreier Intervalle.

Neben der systemischen Toxizität weisen einige Zytostatika zusätzlich eine spezifische Toxizität auf. So ist beispielsweise für Doxorubicin eine Kardiotoxizität nachgewiesen, Methotrexat und Cisplatin wirken nephrotoxisch und neurotoxisch (RUSLANDER 1999). Darin liegt ein weiterer Grund für die Anwendung von Kombinationsprotokollen, da die

Dosis eines spezifisch toxischen Präparates niedriger gewählt werden kann als bei der Monotherapie.

2.2 Methotrexat

2.2.1 Struktur und Wirkungsmechanismus

Das Zytostatikum Methotrexat (MTX, Amethopterin) gehört als Folsäureantagonist zur Gruppe der sog. „Antimetabolite“ und wurde in der Humanmedizin erstmalig 1949 eingesetzt (SEEGER et al. 1949). Im Vergleich zur Folsäure unterscheidet es sich durch eine Amino- anstelle einer Hydroxylgruppe in Position 4 am Pteridinring und einer zusätzlichen Methylgruppe in Position 10 (s. Abb.1). Durch diese Modifikation besitzt MTX als Struktur analogon eine hunderttausendfach höhere Affinität zur Dihydrofolatreduktase (DHFR) als das natürliche Substrat Dihydrofolat. Durch die kompetitive Hemmung des Enzyms wird die Bildung von 5-Methyltetrahydrofolat inhibiert, wodurch die physiologischen Methylierungsschritte für die Biosynthese von Purinbasen und Thymidinmonophosphat als Nukleinsäure-Vorstufen ausbleiben (VOET u. VOET 1992, KAMEN 1997). MTX wirkt demnach phasenspezifisch in der S-Phase des Zellzyklus.

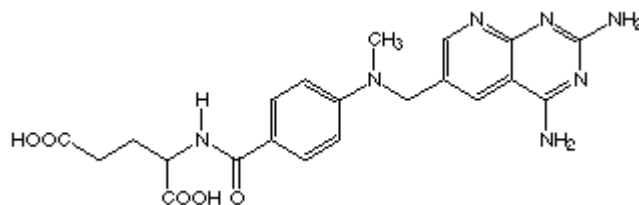


Abb. 1: Strukturformel von Methotrexat (MTX, Amethopterin, 4-Amino-N-methylpteroylglutaminsäure)

2.2.2 Chemotherapeutischer Einsatz und Nebenwirkungen von Methotrexat

In der Veterinärmedizin wird MTX vorwiegend zur Behandlung von Lymphomen und lymphatischen Leukämien eingesetzt (MACEWEN et al. 1987, LINK u. HIRSCHBERGER 1999, TESKE 1999). Dabei ist beim Hund das kanine maligne Lymphom die am häufigsten zytostatisch behandelte Krankheit (HIRSCHBERGER et al. 2000), bei der Katze stellen die feline Leukose und Lymphosarkome Hauptindikationen für den Einsatz von MTX dar

(MALIK et al. 2001). Weiterhin findet MTX Anwendung bei myeloproliferativen Erkrankungen (TESKE 1999), Osteosarkomen, dem transmissiblen venerischen Tumor (ROSENTHAL 1985) und selten bei Mammatumoren (RILEY u. RILEY 1982). Aus den oben aufgeführten Gründen (s. 2.1) wird MTX in Kombinationsprotokollen mit anderen Zytostatika in einer niedrigeren Dosierung von $2,5 \text{ mg/m}^2$ Körperoberfläche per os tgl. bzw. $0,6\text{-}0,8 \text{ mg/m}^2$ Körperoberfläche i.v. alle 3 Wochen angewandt.

Im Gegensatz dazu beträgt die Dosis in der Humanmedizin $30 \text{ mg/m}^2\text{-}12 \text{ g/m}^2$ i.v. bei neoplastischen Erkrankungen wie akuten Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen, Osteosarkomen und Tumoren im Brust- und Kopfbereich (DELEPINE et al. 1995, BARNERJEE et al. 2002, KINOSHITA 2003). Aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung wird MTX auch bei nicht neoplastischen Erkrankungen mit gestörter Zellproliferation wie der Psoriasis vulgaris und bei rheumatoiden Formen der Arthritis in einer niedrigeren Dosierung von $5\text{-}25 \text{ mg/Woche}$ per os bei Humanpatienten eingesetzt (KREMER et al. 1995, CRONSTEIN 2005).

Die Nebenwirkungen von MTX betreffen durch die Hemmung der Zellproliferation v.a. die Zellen des hämatopoetischen Systems und die Schleimhautepithelien des Gastrointestinaltraktes. Infolge der Myelosuppression steht klinisch die Neutropenie mit der Gefahr der Entwicklung einer Sepsis im Vordergrund. Die gastrointestinalen Symptome in Form von Anorexie, Vomitus und Diarrhoe sind zwar häufig nicht schwerwiegend, führen aber zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten und zur Belastung des Tierhalters (RUSLANDER et al. 1999, HIRSCHBERGER et al. 2000). Eine Alopezie ist seltener als in der Humanmedizin zu beobachten und betrifft Hunde mit permanentem Haarwachstum (z.B. Pudel, Malteser, Bobtail), bei der Katze kann es zum Verlust der Tastaare kommen (RUSLANDER et al. 1999).

Weiterhin wirkt MTX spezifisch toxisch auf Leber und Niere. Die Organtoxizität manifestiert sich in reversiblen Hepatitiden und Leberfibrosen bzw. einer akuten renalen Tubulusnekrose. In der Humanmedizin werden bei einer hohen Dosierung von MTX zudem neurologische Störungen beschrieben (SMELAND et al. 1996, JOSTING et al. 1998). Zur Abwendung schwerer toxischer Nebenwirkungen besteht für MTX die Möglichkeit, ein Antidot in Form von Formyltetrahydrofolsäure (Leukovorin) protektiv einzusetzen. Der Überschuss an Tetrahydrofolat verdrängt MTX aus seiner Bindung mit der DHFR und dient der Biosynthese von Nukleinsäurevorstufen in den nicht entarteten Zellen. Zugleich wird aber auch die Zytotoxizität von MTX auf die Tumorzellen herabgesetzt (ALLEGRA et al. 1990, VAN der WILT et al. 1995).

2.2.3 Pharmakokinetik und Membrantransport von Methotrexat

MTX wird parenteral, aber auch oral bis zu einer Dosierung von 30 mg/m² Körperoberfläche nahezu vollständig resorbiert. Da es die Blut-Hirnschranke nicht passieren kann, ist bei primären und sekundären Tumoren des ZNS eine intrathekale Injektion nötig (ALBRECHT 1992). Die Verteilung von MTX in die Organe führt zu einer ersten Halbwertszeit von 0,75 h im Blut. Die Halbwertszeit der renalen Elimination beträgt 2-3 h. Im Blutplasma ist MTX zu ca. 50% an Albumin gebunden und wird zu 90% renal durch Filtration, bei hoher Dosis auch aktiv tubulär sezerniert (JOSTING et al. 1998). Der Anteil der hepatobiliären Exkretion steigt mit zunehmender Plasmakonzentration auf bis zu 50%, ist aber sättigbar bei Plasmaspiegeln von über 800 µM (BREMNES et al. 1989, KAMEN 1997).

MTX wird vorwiegend unverändert ausgeschieden, nur ca. 10% unterliegen einer Metabolisierung zu bisher drei bekannten MTX-Metaboliten. Durch die Anlagerung von bis zu sechs Glutaminsäuren über die intrazelluläre Folylpolyglutamatsynthetase (FPGS) werden Methotrexat-Polyglutamate (MTX-PG) gebildet (GALIVAN et al. 1987). Diese haben eine hohe Affinität zur DHFR und wirken als aktive Metaboliten. Während MTX als Monoglutamat aufgrund des geringen Molekulargewichts noch unverändert aus der Zelle ausgeschieden wird, bedarf es bei den MTX-PG der Abspaltung der Glutamatkette durch die Gammaglutamylhydrolase (GGH). Durch die Retention von MTX-PG wird die DHFR längerfristig inhibiert und erklärt die anhaltende zytostatische Wirksamkeit nach Efflux der unveränderten MTX-Substanz. Die Polyglutamatbildung findet in den verschiedenen Geweben und individuell in unterschiedlichem Ausmaß statt, welches Auswirkungen auf die selektive Wirksamkeit von MTX impliziert (POSER et al. 1981, CHABNER et al. 1985).

Eine weitere Metabolisierung erfährt MTX durch die Überführung in 7-Hydroxy-Methotrexat (7-OH-MTX) durch die hepatozelluläre Aldehydoxidase. 7-OH-MTX erreicht nur ein Hundertstel der Zytotoxizität von MTX und führt damit zu einer Verminderung der chemotherapeutischen Wirksamkeit. An Bedeutung gewinnt dieser inaktive Metabolit jedoch durch seine spezifische Nephrotoxizität, da er aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit präzipitieren und damit direkt eine Schädigung in Form einer akuten Tubulusnekrose auslösen kann (SMELAND et al. 1996, JOSTING et al. 1998).

Unbedeutend ist die geringe Metabolisierung durch Darmbakterien zu 2,4-Diamino-N¹⁰-methylpterinsäure (DAMPA) als inaktiven Metaboliten (DONEHOWER et al. 1979).

Folsäure und deren Derivate spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus (s. 2.2). Da Säuger nicht zur Biosynthese von Folaten befähigt sind, bedarf es einer über Transportproteine vermittelten Aufnahme in die Zelle.

Der Transport von Folat wird vorwiegend über Folatrezeptoren (FRs) vermittelt, für die drei Gene codieren und entsprechend als $FR\alpha$, $FR\beta$ und $FR\gamma$ bezeichnet werden. (BRIGLE et al. 1992, SHEN et al. 1994). Die glykosylierte Form des Rezeptors hat ein vorausgesagtes Molekulargewicht (MG) von 40 kDa (LUHRS 1991). Während $FR\alpha$ und $FR\beta$ über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der äußeren Zellmembran verbunden sind, fehlt $FR\gamma$ diese Bindung und ist damit nicht am Folat-Transport beteiligt (SHEN et al. 1995). Das Folat gelangt nach Bindung an die FRs als Folat-FR-Komplex über Endozytose ins Zytosol, dissoziiert und die FRs werden zur Membran zurück transportiert (KAMEN et al. 1988, ROTHBERG et al. 1990). Die FRs weisen eine hohe Affinität für Folat ($K_d \sim 1 \text{ nM}$) und eine geringe Affinität ($K_d \sim 100 \text{ nM}$) für reduzierte Folate wie Methyltetrahydrofolat (5- CH_3 -THF) und Formyltetrahydrofolat (5-CHO-THF) sowie MTX auf (JANSEN 1999).

Die Aufnahme von reduzierten Folaten und MTX wird vornehmlich als aktiver Transport über den Reduced Folate Carrier (RFC) vermittelt (s. 2.3). Dieser besitzt eine hohe Affinität für diese Substrate (K_m -Wert $\sim 2\text{-}5 \text{ }\mu\text{M}$) und eine vielfach geringere Affinität für Folat (K_m -Wert $\sim 200\text{-}400 \text{ }\mu\text{M}$; GOLDMAN et al. 1968, WESTERHOF et al. 1995, HONSCHA u. PETZINGER 1999).

Vertreter der Organischen Anionen Transportierenden Polypeptide (OATP) und der Organischen Anionen Transporter (OAT) sind weiterhin am Transport von (reduzierten) Folaten und MTX beteiligt (MATHERLY u. GOLDMAN 2003, TAKEDA et al. 2002).

Die Elimination von Folaten und Antifolaten erfolgt über die Multidrug Resistance-Associated Proteine (MRP) 1-4 der ATP-binding cassette (ABC)-Superfamilie (HOOIJBERG et al. 1999, CHEN et al. 2002).

2.2.4 Resistenzmechanismen gegenüber Methotrexat

Die Wirksamkeit der Chemotherapie wird häufig durch Resistenzen der Tumoren gegen die verfügbaren Zytostatika begrenzt. Diese Resistenz kann intrinsisch vorliegen wie z.B. von STEWARD u. GORDON (1991) für hepatozelluläre und gastrointestinale Tumoren beschrieben. Eine durch die andauernde Exposition mit dem Zytostatikum erworbene Resistenz ist v.a. bei lymphoproliferativen Neoplasien zu beobachten (MADEWELL 1999). So entwickelt die Hälfte der chemotherapeutisch behandelten Hunde mit malignem Lymphom

nach 7-9 Monaten ein Rezidiv, das nicht mehr auf die zuvor verwendeten Zytostatika anspricht (ETTINGER 2003). Kombinationsprotokolle senken zwar das Risiko einer Resistenzentwicklung, es existieren jedoch auch Resistenzen gegen verschiedene, strukturell unterschiedliche Zytostatika. Dieser Zustand wird als Vielfachresistenz oder Multidrug Resistance (MDR) bezeichnet (DANO 1973).

Die Resistenz gegenüber MTX beruht auf verschiedenen Mechanismen, die unabhängig voneinander aber auch gleichzeitig auftreten können. Sie betreffen die DHFR, die MTX-PG-Akkumulation und/oder den Transport von MTX in und aus der Zelle.

So führt eine gesteigerte Enzymaktivität der DHFR durch eine erhöhte Expressionsrate des Enzyms zu einer geringeren Wirksamkeit von MTX. Eine Punktmutation des DHFR-Gens, die intrinsisch vorliegen kann oder durch die andauernde Exposition hervorgerufen wurde, resultiert in einer verringerten Affinität von der DHFR zu MTX (BERTINO et al. 1996, SPENCER et al. 1996, BANERJEE et al. 2002).

Die Retention des Metaboliten MTX-PG spielt eine entscheidende Rolle für die selektive Wirkung von MTX (s. 2.2.3). Eine verminderte Polyglutaminierung in Tumorzellen durch eine intrinsisch geringe bzw. im Verlauf der Therapie herabgesetzte Expression des Enzyms FPGS (GOKER et al. 1993, BERTINO et al. 1996) oder ein verstärkter Abbau von MTX-PG durch eine erhöhte Aktivität der GGH stellen daher einen weiteren wichtigen Resistenzmechanismus dar (RHEE et al. 1993).

Von zentraler Bedeutung sind die verminderte Aufnahme von MTX in die Tumorzelle sowie der verstärkte Efflux des Chemotherapeutikums. Der Membrantransport von MTX erfolgt wie in 2.2.3 beschrieben durch verschiedene Transportproteine. So wird die Aufnahme von MTX in niedrigen Dosierungen vorwiegend durch den Reduced Folate Carrier (RFC) vermittelt (GOLDMAN u. MATHERLY 1986). Eine verminderte Aktivität dieses Transportproteins konnte auf eine verminderte Transkriptionsrate (GORLICK et al. 1997) und auf Punktmutationen zurückgeführt werden (ZHAO et al. 1999, DRORI et al. 2000, YANG et al. 2003, s. 2.3). Eine Überexpression der für die Elimination verantwortlichen Multidrug Resistance-Associated Proteine (MRP) konnte als Ursache für den verstärkten Efflux von MTX nachgewiesen werden (NORRIS et al. 1996, HOOIJBERG et al. 1999).

2.3 Reduced Folate Carrier/ Reduced folate carrier (RFC/ Rfc) / Methotrexat-Carrier der Ratte (MTX-Carrier)

2.3.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines Transportsystems für reduzierte Folate und MTX und dessen Gewebsexpression

Der Membrantransport von reduzierten Folaten (5-CH₃-THF, 5-CHO-THF) und MTX wurde bereits 1968 einem spezifischen Transportsystem, dem Reduced Folate Carrier- System, zugeschrieben (GOLDMAN et al. 1968, SIROTNIAK et al. 1968). Inzwischen konnte die für das Transportprotein RFC codierende cDNA aus Maus und Hamster (Dixon et al. 1994, Williams et al. 1994), sowie auf dessen Grundlage der humane RFC (hRFC) aus einer cDNA library isoliert werden (MOSCOW et al. 1995; WONG et al. 1995). Ein Transportsystem für MTX wurde auch in Leber und Niere der Ratte nachgewiesen, das zunächst aufgrund funktionell differierender Eigenschaften zum RFC als Methotrexat-Carrier der Ratte (MTX-Carrier) bezeichnet wurde (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). In weiterführenden vergleichenden Studien konnten KNEUER und HONSCHA (2004) jedoch die Orthologie des MTX-Carriers mit dem hRFC nachweisen (s. 2.3.2). Gemäß der Nomenklatur für Transportproteine wird der murine Rfc als mRfc, der Rfc des Hamsters als haRfc und der humane RFC als hRFC bezeichnet. Für den Rfc der Ratte (rRfc) wird wegen der zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch unbekannten Genstruktur des rRfc (s. 2.5) die Bezeichnung MTX-Carrier synonym weiterhin verwendet.

Der RFC ist ein aktives Transportsystem für reduzierte Folate und MTX mit einer hohen Substrataffinität (K_m -Wert: 2-5 μ M) und einer geringen Transportkapazität (V_{max} : 2-40 pmol/min/mg Protein; GOLDMAN et al. 1968, WESTERHOF et al. 1995, HONSCHA u. PETZINGER 1999, SIERRA u. GOLDMAN et al. 1999). Für andere Antifolate wie z.B. Aminopterin besteht teils eine noch höhere Affinität (MATHERLY et al. 1985, WESTERHOF et al. 1995). Der Transport ist temperatur-und energieabhängig. Der RFC besitzt keine ATP-Bindungsdomäne, so dass der Transport nicht an die direkte Hydrolyse von ATP gekoppelt sein kann. Vielmehr ist die Aufnahme der bei physiologischen pH als hydrophile Anionen vorliegenden Substrate des RFC an einem transmembranären pH-Gradienten gebunden, so dass ein Symport von Folat/H⁺ oder ein Antiport von Folat/OH⁻ vermutet wird (GANAPATHY et al. 2004).

Während der RFC als natriumunabhängig charakterisiert wurde (MATHERLY u. GOLDMAN 2003), wurde die über den MTX-Carrier vermittelte Aufnahme von MTX in frisch isolierten Rattenhepatozyten sowie in mit der cDNA des MTX-Carriers transfizierten Zelllinien als strikt natriumabhängig beschrieben (>90%; HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). Dies führte zu der Annahme zweier unterschiedlicher MTX-Transportsysteme für Mensch und Ratte. Vergleichende Studien zwischen dem hRFC und dem MTX-Carrier konnten jedoch zeigen, dass die MTX-Aufnahme in beiden Fällen bei einem pH-Wert von 7,5 natriumabhängig und bei einem pH von 5,5 natriumunabhängig erfolgte (KNEUER u. HONSCHA 2004). Desweiteren wurde festgestellt, dass die RFC/MTX-Carrier vermittelte MTX-Aufnahme bei pH 5,5 im Vergleich zu pH 7,5 annähernd 3fach erhöht ist. Eine Hemmung des MTX-Transports durch Zugabe von Folat erfolgte bei pH 5,5, nicht jedoch bei pH 7,5 (HORNE 1990, RAJGOPAL et al. 2001, KNEUER u. HONSCHA 2004).

Die mRNA des hRFC wurde durch WHETSTINE et al. (2002) in 68 humanen Geweben und in 8 Tumorzelllinien nachgewiesen. Die höchsten Expressionsraten wiesen dabei Leber und Plazenta auf, gefolgt von Leukozyten, Niere, Lunge, Knochenmark und Darm. Weniger stark hingegen war die Expression in Anteilen des ZNS und im Skelett- und Herzmuskelgewebe. Eine ähnliche Gewebeverteilung konnte auch für den Rfc der Maus detektiert werden (WANG et al. 2001). HONSCHA und PETZINGER (1999) wiesen die mRNA des MTX-Carriers in Niere, Leber, Lunge, Herz, Gehirn, Milz und Skelettmuskel der Ratte nach, mit der höchsten Expression in der Niere.

GONG et al. (1999) konnten ermitteln, dass die RNA-Expression des RFC zellzyklusspezifisch erfolgt, mit der höchsten Expressionrate im Übergang von der G1 in die S-Phase bzw. in der frühen S-Phase des Zellzyklus. Diese Ergebnisse korrespondieren mit der vom Zellzyklus abhängigen Expression der DHFR (BURGER et al. 1994, SCHILLING u. FARNHAM 1994).

Der RFC/MTX-Carrier ist in der Zellmembran und abhängig vom Gewebe in der apikalen Zellmembran von Retina, Intestinum und des Plexus choroideus und basolateral in Niere und Leber lokalisiert (WANG et al. 2001, KNEUER et al. 2005). In Studien an einer humanen Tumorzelllinie wurde der hRFC zudem in der Mitochondrienmembran nachgewiesen (TRIPPETT et al. 2001).

Das ubiquitäre Vorkommen des RFC spricht trotz anderer am Folat/Antifolat-Transport beteiligten Transportproteine (s. 2.2.3) für seine entscheidende Rolle im physiologischen Folatmetabolismus sowie in der Antifolat-Therapie.

2.3.2 Analyse der Topologie des RFC/Rfc und Homologievergleich zwischen den Spezies

Die isolierten cDNAs des Rfc/RFC von Maus, Hamster und Mensch codieren für ein Protein mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 58kDa, 59 kDa und 65 kDa (DIXON et al. 1994, MOSCOW et al. 1995, WILLIAMS et al. 1994). Der MTX-Carrier besitzt mit 512 Aminosäuren ein vorausgesagtes Molekulargewicht von 58 kDa (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). Über Computeranalysen der Aminosäuresequenzen bei den verschiedenen Spezies wurde ein Modell der Proteinstruktur des RFC/MTX-Carriers erstellt (FERGUSON u. FLINTHOFF 1999, HONSCHA et al. 2000, MATHERLY u. GOLDMAN 2003). Speziesübergreifend besitzt das Membranprotein demnach 12 Transmembrandomänen (TMD) mit intrazellulär lokalisierten Amino (N)- und Carboxyl (C)-Termini und einer großen intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7. In der extrazellulären Schlaufe zwischen TMD 1 und 2 ist außer für den Rfc der Maus eine Glykosylierungsstelle vorhergesagt (FERGUSON u. FLINTHOFF 1999, WONG et al. 1998, HONSCHA et al. 2000). Desweiteren sind für den MTX-Carrier zwei mögliche Phosphorylierungsstellen am Übergang zur TMD 1 und in der intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 postuliert (HONSCHA et al. 2000). Die vorausgesagte Topologie konnte inzwischen experimentell durch eine Kombination aus Hämagglutinin-Epitop-Insertion, Glykosylierungsstudien und einer sog. "Scanning Cysteine Accessibility Method" (SCAM) bestätigt werden (WONG et al. 1998, FERGUSON u. FLINTOFF 1999, LIU u. MATHERLY 2002, CAO u. MATHERLY 2004). Die Aminosäuresequenz des Proteins von Nager und Mensch stimmt zu 66-67% überein. Die Homologie ist dabei in den TMD 1-5, 7 und 8 am höchsten, geringer in TMD 6, den TMD 9-12 und in den verbindenden Schlaufen zwischen den TMD. Die geringste Übereinstimmung findet sich in den Termini (KNEUER u. HONSCHA 2004). Die Aminosäuresequenz ist bei Ratte, Maus und Hamster zu 80-90% identisch und weist auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft des Rfc innerhalb dieser Gruppe hin.

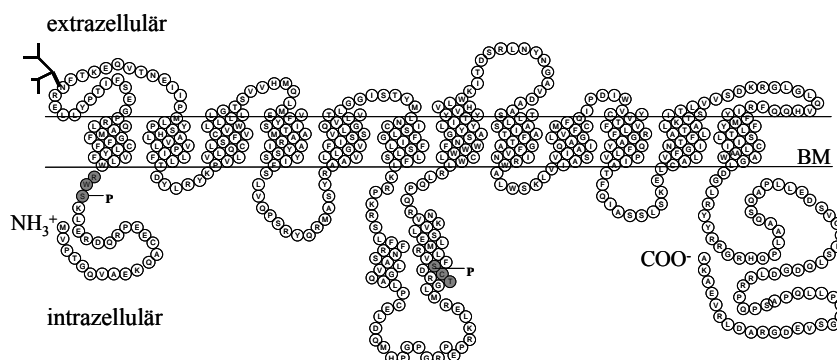


Abb. 2: Modell des MTX-Carriers/Rfc der Ratte nach HONSCHA et al. (2000)

2.3.3 Identifizierung funktionell bedeutsamer Aminosäuren und Strukturen des RFC/Rfc

Durch die Isolation der codierenden cDNAs des RFC/MTX-Carriers konnte ein experimentell bestätigtes Modell für die Proteinstruktur des Transportproteins erstellt werden. Über die Bedeutsamkeit der einzelnen Strukturen bzw. bestimmter Aminosäuren für die Membranexpression des Proteins und den Membrantransport reduzierter Folate und MTX ist bislang jedoch noch wenig bekannt.

In MTX-resistenten Tumorzelllinien konnten mutationsbedingte Veränderungen bestimmter Aminosäuren insbesondere in TMD 1 festgestellt werden, die mit dem Verlust der Transportaktivität in Zusammenhang standen, so an Val27 (Nomenklatur hRFC), Gly44, Glu45, Ser46, Ile48, Val106, Trp107, Ser127, Ala132 und Ser313 (BRIGLE et al. 1995, WONG et al. 1999, ZHAO et al. 1999a, DRORI et al. 2000a). Erkenntnisse über weitere potentiell wichtige Aminosäuren resultieren aus Mutagenesestudien, in denen bestimmte Aminosäuren gegen andere ausgetauscht wurden. SHARINA et al. (2001) ersetzten im murinen Rfc (mRfc) Arginin durch Leucin in verschiedenen TMDs. Dies führte in TMD 4 (Arg131, Nomenklatur mRfc), 5 (Arg155) und 10 (Arg366) zu einem vollständigem Verlust der Transportaktivität, in TMD 1 (Arg26 und 42), 9 (Arg332) und 11 (Arg404) hingegen nur zu minimalen Effekten. Cystein ist nach CAO u. MATHERLY (2003) weder strukturell noch funktionell von Bedeutung, denn der Austausch gegen Serin an Cys30 (Nomenklatur hRFC), 33, 220, 246, 365, 396 und 458 blieb ohne Auswirkungen. Die Substitution von Cystein an Position 37-48 zeigte, dass die Aminosäuren an Position 40, 44, 45 und 48 wichtig für die Transportaktivität sind. Ebenfalls durch die Substitution von Cystein wiesen HOU et al. (2006) den Aminosäuren Arg133 (Nomenklatur hRFC), Ile134, Ala135, Tyr136, Ser138 (TMD 4), Tyr281 (TMD 7), Ser313 (TMD 8) und Arg373 (TMD 10) eine funktionelle Bedeutung zu. Der Austausch von Lys411 (Nomenklatur hRFC) in TMD 11 gegen Glu, Arg und Leu führte zu einer geringeren Aufnahme von MTX, bei dem Ersatz durch Leu und Glu auch zu einer verringerten, bei der Substitution von Arg zu einer erhöhten Aufnahme von Folat (WITT u. MATHERLY 2002). Der einzelne Austausch von Asp88 (Nomenklatur hRFC) gegen Lysin und Arg133 gegen Valin in TMD 2 und 4 führte zu einem Verlust der Transportaktivität, während beim gleichzeitigen Austausch der Aminosäuren, die Transportfähigkeit wieder hergestellt wurde. Dies führte LIU u. MATHERLY (2001) zu Vermutungen über die Tertiärstruktur des Proteins, nachdem sich TMD 2 und 4 in räumlicher Nähe zueinander befinden.

Der Identifizierung bedeutsamer Strukturen des RFC wurde sich über Deletions-Mutagenesestudien genähert. Besondere Aufmerksamkeit galt hierbei den beiden Termini und der großen intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7.

Deletionen am N-Terminus von 27 Aminosäuren (1-27) beim hRFC bzw. 16 Aminosäuren (7-22) beim Hamster (haRfc) hatten nur geringe Effekte auf die Transporteigenschaft und die subzelluläre Lokalisation des Proteins, ebenso hatte die Entfernung von 139 Aminosäuren am C-Terminus beim hRFC bzw. 57 Aminosäuren beim haRfc keine große Auswirkungen (MARCHANT et al. 2002, SADLISH et al. 2002). Beim mRfc führte die C-terminale Deletion von 68 Aminosäuren jedoch zu einem Funktionsverlust, der mit einer ausbleibenden Membranlokalisation des Proteins in Zusammenhang stand (SHARINA et al. 2002). Längere N- und C-terminale Deletionen (TMD1-6, TMD 7-12) führten auch beim hRFC zu einer abweichenden intrazellulären Verteilung der Proteinkonstrukte (MARCHANT et al. 2002, WITT et al. 2004). Im Zuge dieser Studien wiesen WITT et al. (2004) den TMDs 7-12 eine Substratbindungsdomäne zu, die HOU et al. (2005) in TMD 11 lokalisierten.

Die Bedeutsamkeit der großen intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 wurde ebenfalls durch Deletions-Mutagenesestudien charakterisiert. Bei Deletionen von 31-66 (mRfc) bzw. 45-67 (haRfc) zwischen TMD 6 und 7 lokalisierten Aminosäuren blieben die Transportfähigkeit und die Membranlokalisation bei den kleineren Deletionen erhalten. Längere Deletionen zwischen TMD 6 und 7 von ≥ 57 (mRfc) bzw. ≥ 53 (haRfc) AS führten hingegen zum Funktionsverlust, wobei den 11 AS an Position 202-212 (mRfc) bzw. 204-214 (haRfc) besondere Bedeutung zugemessen wurde (SADLISH et al. 2002, SHARINA et al. 2002). Durch Deletionen von 49 und 60 Aminosäuren zwischen TMD 6 und 7 war auch beim hRFC die Transportfähigkeit aufgehoben. Interessanterweise konnte diese durch das Einfügen nicht homologer Aminosäuren aus der Schlaufe eines strukturanalogen Transportproteins für Thiamin (SLC19A2) wieder hergestellt werden. Für eine optimale Transportfähigkeit war nur die korrekte Aminosäuresequenz an Position 204-214 in der Schlaufe von Bedeutung (LIU et al. 2003). Da die Homologie in den Schlaufen beider Transporter nur 18 % beträgt, ist anzunehmen, dass die Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 zwar strukturell von großer Bedeutung, aber relativ unabhängig von der Aminosäuresequenz ist.

Die Glykosylierung an der ersten extrazellulären Schlaufe zwischen TMD 1 und 2 ist nach WONG et al. (1998) weder für den Transport noch für die subzelluläre Lokalisation des Proteins von Bedeutung.

2.4 Alternatives Spleißen (Splicing)

Erste Erkenntnisse über das alternative Spleißen ergaben sich aus Studien der viralen Genexpression mit der Entdeckung von Exons und Introns im Genom des Adenovirus (SAMBROOK 1977) und der Feststellung durch GILBERT (1978), dass die alternative Kombination der Exons zu verschiedenen mRNAs aus einem Gen führen kann. Viren nutzen demnach die Vorteile des alternativen Spleißen für die Vielfältigkeit ihrer Genexpression und zur Erweiterung ihres proteomischen Potentials bei einem limitierten Genom (BERGET et al. 1977, CHOW et al. 1977).

Das Spleißen der RNA ist ein präzise regulierter Prozess zwischen der Gentranskription und der Translation der mRNA (BRACCO u. KEARSEY 2003). Die transkribierte Vorläufer-mRNA (Prä-mRNA) stellt eine Kopie der genomischen DNA dar, bestehend aus Exons und Introns. In der Regel bezeichnen Exons die codierenden Abschnitte, die in der mRNA präsent sind, als Introns werden die Abschnitte bezeichnet, die zwischen den Exons lokalisiert sind und im Verlauf der Reifung der Prä-mRNA zur mRNA gespleißt werden. Das Spleißen beinhaltet die Entfernung der Introns und die Ligation der Exons und wird durch RNA-Proteinkomplexe, den sog. „snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles)“, die mit der Prä-mRNA das Spleißosom bilden, katalysiert (JURICA u. MOORE 2003, NILSEN 2003).

Die meisten eukaryotischen Gene weisen Exons und Introns auf. Die im Vergleich zu den Exons meist sehr viel längeren Intronsequenzen zeichnen sich am 5'- und 3'- Ende, den sog. „Splice-Sites“, durch eine Grenzsequenz aus (PADGETT et al. 1986). In der Regel beginnt ihre Sequenz mit den Nukleotiden GT am 5'-Ende und endet mit AG am 3'-Ende, im humanen Genom weisen 99,24% der Introns diese sog. GT-AG-Regel auf (BURSET et al. 2000). Die Ausnahme bildet eine AT-AC-Sequenz am 5'- bzw. 3'-Ende (WU u. KRAINER 1998, TARN u. STEITZ 2001).

Das konstitutive Spleißen beschreibt den Umstand der Entfernung aller Introns und die Ligation aller Exons. Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit des alternativen Spleißens, indem bestimmte Splice-Sites nicht bzw. zusätzliche Splice-Sites genutzt werden. Daraus ergeben sich 4 Formen des alternativen Spleißens, die in Abb. 3 dargestellt sind: Überspringen eines Exons, Retention eines Introns und die Nutzung alternativer 3'- und 5'-Splices-Sites (LOPEZ 1998, ZHENG et al. 2004).

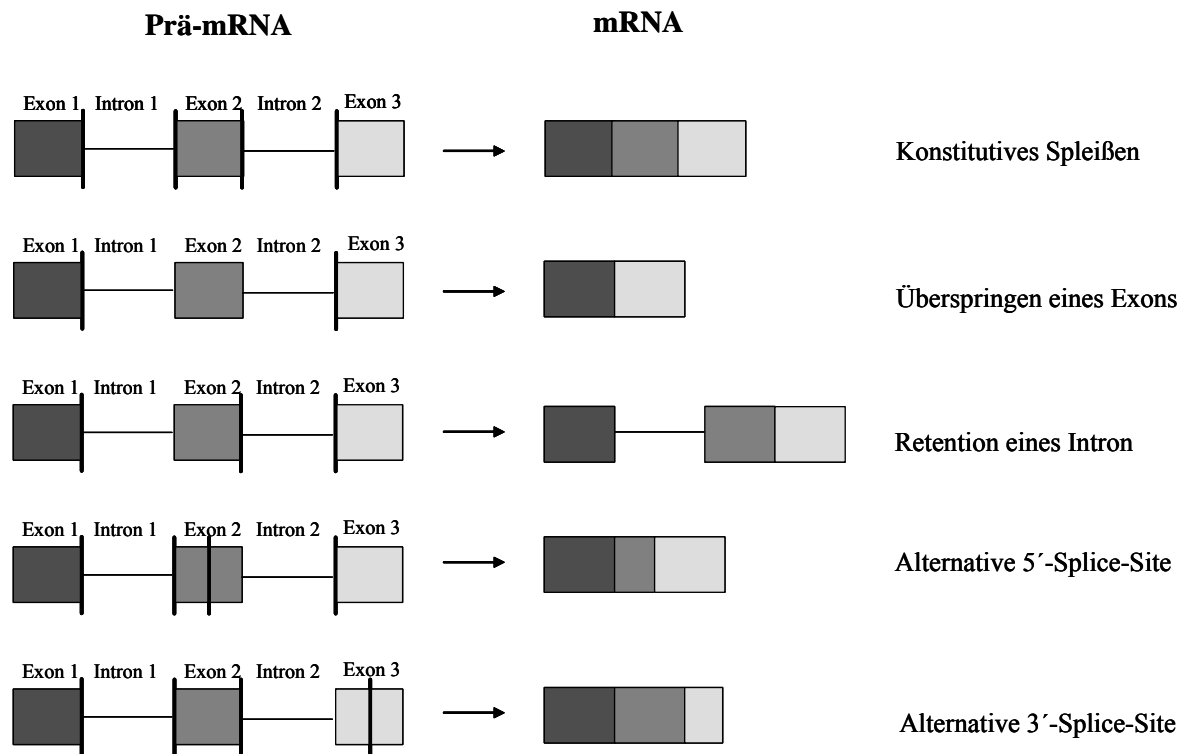


Abb. 3: Formen des alternativen Spleißens

Die Balken kennzeichnen, an welcher Stelle die Prä-mRNA gespleißt wurde. Durch die Nicht-Nutzung bestimmter Splice-Sites sowie die Nutzung zusätzlicher alternativer Splice-Sites ist die Generierung verschiedener mRNA-Transkripte aus einer Prä-mRNA möglich. Eine Kombination dieser Prozesse ist möglich.

Entgegen der früheren Annahme, dass nur ca. 5% der Gene alternativ gespleißt werden (SHARP 1994), sagen neuere Analysen mittels bioinformatischer Methoden voraus, dass 35-60 % der humanen Genprodukte dem alternativen Spleißen unterliegen (MIRONOW et al. 1999, KAN et al. 2001, MODREK et al. 2001). Damit gewinnt der Vorgang des alternativen Spleißens auch in der Forschung zunehmend an Bedeutung. Über die genauen Faktoren, die zur Selektion der entsprechenden Splice-Sites führen, ist derzeit noch wenig bekannt. Nach SMITH u. VALCAREL (2000) handelt es sich um einen komplexen Prozess, der von einer Kombination verschiedener cis- und transaktiver regulatorischer Mechanismen abhängig ist. In einzelnen Fällen konnte nachgewiesen werden, dass ein zell- und gewebsspezifisches alternatives Spleißen stattfindet, das mit einer unterschiedlichen Expression zellulärer Splicing-Faktoren in Zusammenhang steht, so z.B. in unterschiedlichen Stadien der Zelldifferenzierung (HOFMAN und WIRTH 2002).

Im Ergebnis führt alternatives Spleißen zur Veränderung der Struktur der Transkripte und deren Proteine. Bei einer im Verhältnis dazu nur geringen Anzahl von Genen, gelingt durch

diesen Prozess die Generierung einer weitaus größeren Anzahl von mRNA-Varianten und Proteinisoformen (Splicing-Varianten). Es entstehen Deletionen oder Insertionen in der mRNA-Sequenz, die mit und ohne Verschiebung des Leserahmens einhergehen können. Weiterhin können sich diese auf das Start- und Stopp-Codon auswirken (BRACCO u. KEARSEY 2003).

Nach OKAZAKI et al. (2002) betreffen 75% des alternativen Spleißens die codierende Region. Die Deletionen und Insertionen von Sequenzen führen zu Veränderungen der Proteinstruktur. Aus ihnen resultieren zusätzliche oder fehlende Strukturen und bei einer Verschiebung des Leserahmens Änderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins. Als mögliche Konsequenz werden die Aktivität des Proteins, seine subzelluläre Lokalisation oder die Proteinstabilität beeinflusst. Die Effekte können moderat sein, aber auch ein totaler Verlust der Funktion des Proteins ist möglich (FAUSTINO u. COOPER 2003, GRAVELEY 2001).

Alternatives Spleißen führt darüber hinaus zur Möglichkeit der Nutzung alternativer Exons in der regulatorischen 5'- oder 3'- untranslatierten Region (UTR). Konsequenzen ergeben sich hierbei auf Ebene der Translationseffizienz und der Proteinstabilität (BRACCO u. KEARSEY 2003).

Der Generierung vielfältiger mRNA-Varianten durch alternatives Spleißen steht der Abbau alternativer Transkripte entgegen. Dieser Prozess wurde 1979 entdeckt und als NMD (Nonsense Mediated Decay) bezeichnet (LOSSON u. LACROUTE 1979). Er dient mutmaßlich der Degradierung fehlgespleißter mRNA-Varianten. Insbesondere scheinen mRNAs mit vorzeitigem Stopp-Codon (Premature Termination Codon, PTC) dem NMD zugeführt zu werden (MAQUAT 2002, LEWIS et al. 2003). Die Mechanismen und die Regulation des NMD sind sehr komplex und bis heute nur teilweise aufgeklärt. Unter Beteiligung verschiedener Faktoren findet der Prozess nach einem Modell von MCKENDRICK (2002) sowohl im Nukleus nach der Transkription als auch im Zytoplasma während der Translation statt. LEWIS et al. (2003) weisen dem NMD neben der Degradierung fehlgespleißter mRNA eine weitere große Bedeutung im Zusammenhang mit dem alternativen Spleißen zu. Sie vermuten, dass die Generierung alternativer Transkripte nicht allein der Proteomvielfalt, sondern auch der Proteinregulation dient. Abhängig davon, ob diese Transkripte überhaupt generiert und anschließend translatiert oder dem NMD zugeführt werden, postulieren sie damit eine Kopplung von alternativen Spleißen und NMD als ein bisher unterschätzter Mechanismus der Proteinregulation.

2.5 Genomische Organisation und mögliche Splicing-Varianten des RFC/Rfc bzw. des MTX-Carriers

Gemäß der Nomenklatur für Transportproteine gehört der RFC1 zur Genfamilie SLC19A (Solute Carrier 19), der 3 Transportproteine SLC19A1-3 mit hoher struktureller Ähnlichkeit aber differierenden Substratspektren angehören (GANAPATHY et al 2004). Der RFC1 (SLC19A1) transportiert reduzierte Folate/Antifolate, während SLC19A2 und SCL19A3 Transportproteine für Thiamin darstellen.

Für den humanen RFC konnte das SLC19A1-Gen auf Chromosom 21q22.2 (MOSCOW et al. 1995), für den Rfc der Maus und des Hamsters auf Chromosom 21q10 und 21q1 nachgewiesen werden (CHAN et al. 1995, ROY et al. 1998). Die Lokalisation des MTX-Gens der Ratte ist hingegen bislang unbekannt.

2.5.1 hRFC

Erste Studien über die Genstruktur des hRFC identifizierten 2 alternative nicht codierende Exons (Exon A und B) und 5 codierende Exons, die als Exon 2-6 bezeichnet wurden (TOLNER et al 1998, ZHANG et al. 1998). Das Start-Codon wurde in Exon 2, das Stopp-Codon in Exon 6 postuliert (WILLIAMS u. FLINTHOFF 1998). Weiterführende Studien von WHETSTINE et al. (2002) führten zur Identifizierung von insgesamt 7 nicht codierenden Exons (Exon A, A1/A2, B, C, D, E). Diese werden mit Ausnahme von Exon C und E zudem alternativ gespleißt, so dass sich 3 Varianten für Exon A1/A2, 5 Varianten für Exon A, 2 Varianten für Exon B und 3 Varianten für Exon D ergeben. Infolgedessen lassen sich aus den 7 Exons 15 alternative 5'-UTR ableiten (FLATLEY et al. 2004). Über „5'Rapid Amplification of cDNA ends (5'-RACE)“ und „Reverse Transkription- (RT)-PCR“ konnte festgestellt werden, dass die Expression dieser möglichen 15 alternativen 5'UTR des hRFC in Abhängigkeit der verwandten Zellen und Gewebe unterschiedlich erfolgte. So konnte beispielsweise Exon A2 nur in der adulten Leber nachgewiesen werden, Exon B und A1 waren im Herz dominant. Im Darm wurde überwiegend Exon D, in der Plazenta Exon C exprimiert. Die Expressionsmuster unterschieden sich auch im Vergleich zwischen fetalem und adulten Gewebe (WHETSTINE et al. 2002a).

Eine Promotoraktivität für die 7 nicht codierenden Exons konnte bisher nur proximal der Exons A1/A2, A, B und C nachgewiesen werden (WHETSTINE u. MATHERLY 2001, WHETSTINE et al. 2002b, LIU et al. 2004, PAYTON et al. 2005a). Die Regulation der

Promotoren A und B erfolgt vornehmlich über Transkriptionsfaktoren der DNA-bindende bZip Superfamilie und der Zinkfinger-SP Familie: die Transaktivierung des Promotors A erfolgt insbesondere über die Faktoren AP2 und SP1, die Aktivierung des Promotors B vornehmlich über Methylierungs- und Acetylierungsprozesse (WHETSTINE u. MATHERLY 2001). Darüber hinaus sind an der Regulation des Promotors B E-Box- bindende USF und Zinkfinger-Ikaros Proteine beteiligt (LIU et al. 2004), sowie USF1 und Proteine der Zinkfinger-GATA Familie an der Regulation der Promotoren A1/A2 (PAYTON et al. 2005). Als transaktive Elemente für den Promotor C wurden SP1 und C/EBP identifiziert (PAYTON et al. 2005b). Die Beteiligung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren unterstreicht die Möglichkeit einer zell- und gewebsspezifischen Regulation der hRFC-Expression über die verschiedenen 5'-UTR (MATHERLY u. GOLDMAN 2003).

Während die verschiedenen 5'-UTR keine Auswirkungen auf die codierende Region des hRFC-Transkripts haben, wiesen WONG et al. (1999) an einer MTX-resistenten humanen Zelllinie eine Sequenzinsertion des hRFC am Übergang von Exon 1 zu Exon 2 nach. Die Insertion von GATG an Position 191 hat eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge und führt zur Generierung eines vorzeitigen Stopp-Codons an Position 1176. Für diese mögliche Splicing-Variante konnte keine Transportaktivität nachgewiesen werden.

WONG et al. (1995) identifizierten eine Deletion von 626 Basenpaaren (bp) in der cDNA des hRFC, die sowohl die codierende Region ab Exon 5 als auch die 3'-UTR betrifft. Durch die Deletion an Position 1568-2193 der cDNA-Sequenz entfällt das reguläre Stopp-Codon an Position 1774 und stattdessen kommt es zur Nutzung eines alternativen Stopp-Codons an Position 2204. In *in vitro*-Studien wurde das Protein exprimiert und war funktional aktiv (WONG et al. 1995).

Eine weitere cDNA-Variante des hRFC mit einer Deletion von 987 bp wurde von DRORI et al. (2000b) charakterisiert. Durch die Nutzung einer alternativen 5'- Splice-Site in Exon 6 sind 480 bp der codierenden Region und 507 bp der 3'-UTR deletiert. Die cDNA codiert für ein Polypeptid mit nur 490 statt 591 Aminosäuren. Statt des regulären Stopp-Codon in Exon 6 wird ein alternatives Stopp-Codon in der 3'-UTR genutzt. Dies führt am C-Terminus zur Generierung von 58 Aminosäuren aus der genutzten 3'-UTR-Sequenz. Diese Splicing-Variante wies keine Transportaktivität für MTX oder Folate auf, eine akzessorische Funktion des verkürzten Proteins bei gleichzeitiger Expression mit dem nativen hRFC wurde diskutiert (DRORI et al. 2000b).

2.5.2 mRfc

Das mRfc-Gen auf Chromosom 10 umfasst 8 Exons, die als Exon 1, 1a, 2, 3, 4, 5, 5a und 6 bezeichnet werden (TOLNER et al. 1997). Dabei werden die Exons 1a und 5a alternativ zu den Exons 1 und 5 genutzt (SAID et al. 1996, TOLNER et al. 1997). Die nicht codierenden Exons 1 und 1a werden über 2 verschiedene Promotoren aktiviert und deuten auf eine zell- und gewebsspezifische Regulation der mRfc Expression (TOLNER et al. 1998, TOLNER et al. 1999). Als weitere mögliche Splicing-Varianten wurden eine cDNA mit einem verkürzten Exon 3 und eine cDNA mit fehlendem Exon 3 identifiziert (TOLNER et al. 1997). Für diese Varianten ist ein verkürztes Protein von nur noch 10 und 11 TMD vorausgesagt. Ob diese alternativen Transkripte translatiert werden und die möglichen Proteine funktional sind, ist nicht bekannt (MATHERLY u. GOLDMAN 2003). Zusätzliche Splice-Sites in Exon 4 und 5 wurden von BRIGLE et al. (1997) beschrieben, zudem ein mögliches alternatives Exon zwischen Exon 5 und 6. Möglicherweise enthält das Exon 6 ein Intron, das alternativ gespleißt wird (TOLNER et al. 1998).

2.5.3 haRfc

Das haRfc-Gen umfasst mit 2 nicht codierenden (Exon 1-2) und 5 codierenden Exons (3-7) insgesamt 7 Exons (MURRAY et al. 1996). Es wurden 2 mRNA-Varianten identifiziert, von denen eine Variante alle 7 Exons, die andere hingegen eine Deletion von 121 bp korrespondierend mit der Sequenz des Exons 2 aufweist. Durch das alternative Spleißen von Exon 2 ergeben sich 2 unterschiedliche 5'-UTR im haRfc-Transkript ohne Beeinträchtigung der codierenden Region (MURRAY et al. 1996). Weiterhin wurde eine Deletion von 29 bp zu Beginn des Exons 6 beschrieben, die möglicherweise auf die Nutzung einer alternativen Splice-Site zurückzuführen ist, sowie eine Deletion von 757 bp detektiert, die sich durch das Fehlen von Exon 4 auszeichnet (MURRAY et al. 1996, WILLIAMS et al. 1994).

2.5.4 MTX-Carrier der Ratte

Aus der Rattenleber (Rat Liver, RL) konnten bisher 2 mRNA-Varianten identifiziert werden, die als RL-MTX-1 und RL-MTX-2 bezeichnet wurden (HONSCHA et al. 2000). Eine weitere mRNA Variante wurde bei der Erstellung des full-length Klon des MTX-Carriers aus der Rattenniere nachgewiesen (KNEUER et al. 2004). Das Transkript aus der Niere unterscheidet

sich in Hinblick auf den RL-MTX-1 nur in der 5'-UTR, codiert jedoch für das gleiche Protein und wurde dementsprechend als RK (Rat Kidney)-MTX-1 bezeichnet. Bevor die Sequenz der beiden Varianten wieder übereinstimmt, weist der RL-MTX-1 eine nicht homologe Sequenz von 210 bp, der RK-MTX-1 von 47 bp auf. Der offene Leserahmen umfasst in beiden Varianten 1536 bp und codiert für ein Protein mit 512 AS und einem vorausgesagten Molekulargewicht von 58 kDa (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). Der RL-MTX-1 besitzt im Gegensatz zum RK-MTX-1 im Promotorbereich Bindungsmotive für den AhR/ArNT-Rezeptorkomplex und ein Regulationselement, das mit Induktoren vom Phenobarbitaltyp interagiert, der sog. „Barbie Box“ (HONSCHA et al. 2000).

Die mRNA-Variante RL-MTX-2 zeichnet sich im Vergleich zum RL-MTX-1 durch eine Insertion von 203 bp an Position 1196 aus. Die Insertion verschiebt nicht den Leserahmen, beinhaltet aber ein Stopp-Codon. In der Folge codiert die Variante für ein Protein von nur 329 Aminosäuren mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 38 kDa (HONSCHA et al. 2000). Über die funktionelle Bedeutung der Variante MTX-2 gibt es bislang keine Untersuchungen.

Mittels RT-PCR wurde aus der Niere ein PCR-Fragment isoliert und sequenziert, welches eine identische Insertion wie die Variante RL-MTX-2 aufwies und damit einer möglichen Variante RK-MTX-2 zuzuordnen ist (KNEUER et al. 2004). Darüber hinaus wurden über RT-PCR aus der Niere zwei Fragmente höheren Molekulargewichts detektiert. Diese wurden bislang nicht sequenziert, könnten aber möglicherweise auf weitere mRNA-Varianten (MTX-3 und MTX-4) des MTX-Carriers zurückzuführen sein (Persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Walther Honscha, Leipzig, Juni 2002).

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Alternatives Spleißen ist ein Prozess, der es ermöglicht, eine große Anzahl von Transkripten und Proteinisoformen von einer im Vergleich dazu nur geringen Anzahl an Genen zu generieren. Die große Bedeutung dieses Prozesses ist weithin anerkannt und vermehrt werden mögliche Splicing-Varianten durch molekularbiologische Studien entdeckt. Wenig untersucht ist jedoch bisher, ob bzw. welche funktionelle Bedeutung den detektierten möglichen Splicing-Varianten zugesprochen werden kann.

Dies findet auch in der molekularbiologischen Deskription neuer möglicher Splicing-Varianten des RFC seine Entsprechung. Der RFC/MTX-Carrier spielt eine entscheidende Rolle im physiologischen Folatmetabolismus und in der Antifolat-Therapie. Wenig

erschlossen ist hingegen welche Bedeutung dabei den möglichen Splicing-Varianten des Transportproteins beigemessen werden kann. Erkenntnisse über seine möglichen Splicing-Varianten dienen der weiteren Charakterisierung des Transportproteins in Hinblick auf eine erweiterte Kenntnis der physiologischen Zusammenhänge und der daraus resultierenden möglichen therapeutischen Nutzung dieser.

Für den MTX-Carrier der Ratte (s. 2.5.4) konnten bislang 3 mRNA-Varianten nachgewiesen werden (RL-MTX-1, RL-MTX-2, RK-MTX-1). In dieser Arbeit soll die mögliche mRNA-Variante MTX-2 in der Niere nachgewiesen (RK-MTX-2) und aufgeklärt werden, ob die PCR-Produkte höheren Molekulargewichts weiteren möglichen mRNA-Varianten (MTX-3 und MTX-4) zuzuordnen sind. Ziel dieser Arbeit ist es, die möglichen mRNA-Varianten sowohl molekularbiologisch als auch funktionell hinsichtlich einer akzessorischen und/oder eigenständigen Funktion zu charakterisieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Sigma, Deisenhofen
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IPTG	peqlab, Erlangen
Isoamylalkohol	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 400	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma, Deisenhofen
Silikonöl PK 20	Caesar & Lorentz, Hilden
Silikonöl PN 200	Roth, Karlsruhe
Szintillator Rotiszint	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Sigma, Deisenhofen
X-GAL	Novagen, Schwalbach

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.1.2 Geräte

Elektrophorese:

Spannungsgeber Power Supply EPS 600 mit Horizontalgelkammer Biotech GNA 100 und Semi-dry Blotkammer LKB Multiphor I	Pharmacia, Freiberg
Spannungsgeber PAC 200 mit Vertikalgelkammer Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München

Mikroskope:

Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop DMIL	Leica, Wetzlar

Thermocycler:

GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA Engine Peltier PTC-200	MJ Research, Reno, USA

Zentrifugen:

Biofuge 28 RS	Heraeus, Osterode
Tischzentrifugen 5415 C, 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5403 D mit Ausschwingrotor A-8-11	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Evolution RC mit Festwinkelrotor SS-34	Sorval, Bad Homburg

Weitere Geräte:

Autoklav 3870 ELV	Systec, Wettenberg
CO ₂ Brutschrank INCO2/153	Kendro, Hanau
Digitalkamera Powershot G5	Canon, Krefeld
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Beckman, Krefeld
Heracell CO ₂ Inkubator VA 230V	Memmert, Schwabach
Magnetrüttler MR 3001	Heidolph, Schwabach
pH-Meter 761	Calimatic, Knick

Photometer DU 640	Beckmann, München
Schüttelinkubator GFL 3031	Hilab, Düsseldorf
Schwenktisch	Stovall, Greensboro, USA
Stickstoffbehälter GT 40	Deutschland Liquide, Wiesbaden
Ultra-Turrax T25	Jenke & Kunkel, Staufen
UT Dispersing Tool for T 25 0,3-3 ml	Jenke & Kunkel, Staufen
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmeschrank 304	Melag, Berlin
Schüttelwasserbad GLS400	Grant Instruments, Cambridge, England

3.1.3 Materialien für die Molekularbiologie

Primer	5'-3'-Sequenz	T _m (°C)
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGGCT	60
G ₃ PDH-F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	59,4
G ₃ PDH-R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	59,4
RK-MTX-44F	ACGGGTGGAGTGTCATCTTTGT	60,3
RK-MTX-746F	GGAGCCTTGCCCTGTGAG	60,5
RK-MTX-794F	CCAGAGCCCAGGAAACTGG	63,2
RK-MTX-1222R	GGCAATGGGCACAAGGAACT	59,4
MTX-1255R	CTCTCTAGACAGGGAAGATGCAATCTGAAA AGTGGCAATGGGCACAAGGAACT	80
RK-MTX-2-1100F	CCTTGCCCTGGGCTAGACCACCAATGTA	69,5
RK-MTX-2-1132R	CAGCCTACATTGGTGGTCTA	57,3
RK-MTX-2-1229R	GGTAGGAGGCATTTGATCACGGCTGAGC	69,5
RK-MTX-2-1229-5R	GGTAGGAGGCATTTGATCACGGCTGAGCTT GGG	73,2
RK-MTX-2-1229-9R	GGTAGGAGGCATTTGATCACGGCTGAGCTT GGGTAAG	73,9
MTX-2-HA	CTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTACCGGCCCCGCTGGGGT	>75
RK-MTX-5-1042R	GCCGTGATGGCGCCAGAGGCAC	69,6
RK-MTX-6-1158R	TGTCCGGGATTCAGAAGTGTG	59,8

Mit Ausnahme des MTX-1255R (biomers, Ulm) wurden alle Primer von MWG-Biotech, Erlangen synthetisiert.

Restriktionsenzyme:

Mit Ausnahme von XbaI (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden die Restriktionsenzyme BamHI, HincII, EcoRI, KpnI, SmaI, XmaI, SacII und XhoI von New England Biolabs GmbH, Frankfurt bezogen.

Molekulargewichtstandards:

100 bp DNA-Leiter	peqlab, Erlangen
DNA Sizer III	peqlab, Erlangen
Hyperladder I	Bioline, Darmstadt
Proteinmarker IV	peqlab, Erlangen

Antikörper:

Goat Anti-Mouse IgG / RPE	Sigma, Deisenhofen
Goat Anti-Rabbit IgG (whole molecule FITC Conjugate)	Sigma, Deisenhofen
Mouse Monoclonal Anti-HA, Clone HA-7	Sigma, Deisenhofen
Rabbit Polyclonal Anti-HA	Sigma, Deisenhofen
Goat Polyclonal Anti-Rabbit IgG / AP	DakoCytomation, Glasrup

Vektoren:

pCR3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-C2	Clontech, Heidelberg
pIRES	Clontech, Heidelberg

Bakterienstämme:

<i>E.coli</i> Nova Blue	Novagen, Schwalbach
<i>E.coli</i> Top F10	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg

Antibiotika:

Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Kanamycin Monosulfat	Sigma, Deisenhofen

Kommerziell erhältliche Kits:

GeneRacer Core Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Marathon cDNA Amplification Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit/ Mini Kit	Qiagen, Hilden
pSTBlue-1 Acceptor Vektor Kit	Novagen, Schwalbach
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Topo TA Cloning Kit pCR4	Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme und Reagenzien:

Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Cölbe
CIP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
dNTP Mix	peqlab, Erlangen
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Oligo dT ₁₆	MWG-Biotech, Ebersberg
RNAlater	Qiagen, Hilden
Rnase H	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
SAWADY Taq-DNA-Polymerase	peqlab, Erlangen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Weitere Materialien:

Blotting Paper Quick Draw	Sigma, Deisenhofen
Entwickler ProtoBlot R AP System	Promega, Madison USA
Porablot PVDF-Membran	Macherey-Nagel, Düren

Tierorgane

Rattennieren von männlichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von ca. 230 g wurden freundlicherweise vom Herzzentrum der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Die Betäubung erfolgte i.p. mit Trapanal.

3.1.4 Materialien für die Zellkultur

Einmalartikel:

96-well-Platten	Dr. Ilona Schubert, Leipzig
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Kombinat Technisches Glas, Ilmenau
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Mini Vials	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen 400 µl	Roth, Karlsruhe

Alle anderen Einmalartikel wurden von der Firma Greiner bio-one (Frickenhausen) bezogen.

Kulturmedien und Zusätze:

DMEM	PAA, Pasching
DMSO	Sigma, Deisenhofen
FKS	Gibco, Karlsruhe
Geneticin / G 418	Sigma, Deisenhofen
Glutamin	PAA, Cölbe
Inosin	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
MEM	PAA, Cölbe
NEAA	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

Transfektionsreagenzien:

GeneJuice	Novagen, Schwabach
Nanofectin I	PAA, Cölbe
PEI	Sigma, Deisenhofen

Weitere Reagenzien:

Amethopterin	Sigma, Deisenhofen
³ [H]-Methotrexat (6,18 x 10 ⁸ kBq/mmol)	Moravek Biochemicals, Brea
FluorSave Reagent	Calbiochem, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

3.1.5 Puffer und Lösungen

Alkaline lysis solution I	Tris-HCl (pH 8,0)	50	mM
	EDTA	10	mM

Alkaline lysis solution II	NaOH	200	mM
	SDS	1	% (v/v)

DEPC-Wasser	Aqua bidest.		
	DEPC	0,1	% (v/v)
	12h bei 37°C inkubiert, autoklaviert		

³[H]-Mtx (Heiß-Kalt-Gemisch)	³ [H]-Methotrexat	2 x 10 ⁷	dpm
	(6,18 x 10 ⁸ kBq/mmol)		
	Methotrexat (1 mM in		
	150 mM HEPES / 1mM MgCl ₂)	500	µM
	Tyrode-Puffer	ad 1	ml

Kalium-Phosphat-Puffer

Lösung 1:	KH ₂ PO ₄	100	mM
-----------	---------------------------------	-----	----

Lösung 2:	K ₂ HPO ₄	100	mM
-----------	---------------------------------	-----	----

Lösung 2 wird vorgelegt und mit Lösung 1 bis pH 7,4 titriert

Lowry-Lösungen

Lösung 1:	Na ₂ CO ₃ (H ₂ O frei)	186,8	mM
	NaOH	99	mM
	K-Na-Tartrat	5, 61	mM
	SDS	4,95	mM
	ad 1 l Aqua bidest.		

Lösung 2:	CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,6	mM
	ad 1 l Aqua bidest.		

Lösung 3:	1 Teil Lösung 1 + 0,01 Teil Lösung 2		
-----------	--------------------------------------	--	--

PBS	NaCl	137	mM
	KCl	2,7	mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5	mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5	mM
	pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert		
PFA-Fixierlösung 2%	Aqua bidest.	20	ml
	PFA	0,8	g
	mit 4 Tropfen NaOH (1M) 10 min Inkubation bei 60°C		
	PBS (2X)	20	ml
	filtriert (0,2µm)		
RNase-EB-Puffer			
Stocklösung (10 mg/ml)	RNase	1	g
	Aqua bidest.	10	ml
	15 min Inkubation bei 60°C		
Arbeitskonzentration	20 µg/ml EB-Puffer (Tris-HCl, pH 8,5)		
Sammelgelpuffer	Tris	500	mM
	SDS	0,4	% (w/v)
	pH 6,8 mit HCl eingestellt		
.			
TBE 10X	Tris	10	mM
	Borsäure	44,5	mM
	EDTA	1,3	mM
	pH 8,3 mit HCl eingestellt		
TBS	Tris-HCl	20	mM
	NaCl	150	mM
	pH 7,5 mit HCl eingestellt		
TBST	TBS	500	ml
	Tween 20	0,05	% (v/v)

Transferpuffer	Tris	25	mM
	Glycin	192	mM
	Methanol	20	% (v/v)
	pH 8,3 mit HCl eingestellt		
Trenngelpuffer	Tris	1500	mM
	SDS	0,4	% (w/v)
	pH 8,8 mit HCl eingestellt		
Tyrode-Puffer			
Lösung 1:	NaCl	137	mM
	KCl	2,72	mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,05	mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8	mM
Lösung 2:	Na ₂ H ₂ PO ₄	0,42	mM
Pufferansatz:	Lösung 1	12,5	ml
	Lösung 2	0,25	ml
	Glukose	5,5	mM
	NaHCO ₃	12	mM
	pH 7,4 mit NaOH eingestellt, jeweils frisch angesetzt		

3.1.6 Kulturmedien

LB-Agar 1,5%	LB-Medium (pH 7,4)	250	ml
	Agar-Agar	3,75	g
	autoklaviert		
LB-Medium	Bacto-Trypton	10	g
	Hefeextrakt	5	g
	NaCl	10	g
	ad 1L Aqua bidest, pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert		

TSS-Medium	LB-Medium (pH 7,4)	42,5	ml
	PEG 8000	5	g
	DMSO	2,5	ml
	2 M MgCl ₂	1,25	ml
	pH 6,5, sterilfiltriert		
COS-1 und MDCK-Medium	MEM		
	10 % FKS		
	1 x NEAA		
HPCT-1E3 Medium	DMEM		
	10 % FKS		
	10 µg/ml Insulin (sterilfiltriert)		
	10 µg/ml Inosin (sterilfiltriert)		
	1,5 µM Dexamethason (sterilfiltriert)		

3.2 METHODEN

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und Gesamt-RNA wurde durch Messung der Extinktion photometrisch bestimmt. Dabei korrespondiert die Absorption von 1 Unit bei 260 nm mit der Konzentration von 50 µg/µl DNA bzw. 40 µg/µl RNA. Der Reinheitsgrad bestimmt sich über das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm. Der Quotient sollte mindestens 1,8 betragen, da bei 280 nm Proteine absorbieren. Eine Messung bei 320 nm gab Aufschluss über den Anteil an Schwebeteilchen.

3.2.1.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini-Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei werden bei der Lyse und Homogenisierung der Proben die RNasen durch β -Mercaptoethanol (β -ME) und Guanidinisothiocyanat (GITC) inaktiviert. Die RNA wird im Anschluss selektiv an eine Silikat-Gel-Membran in einer Säule in mehreren Zentrifugationsschritten gebunden, gewaschen und eluiert.

Das isolierte Gewebe der kurz zuvor getöteten Ratten wurde zur Stabilisierung der RNA in RNAlater überführt und bei -20°C aufbewahrt. Pro Isolation wurden 30 mg des Gewebes in 600 µl β -ME- und GITC-haltigem Lysepuffer mittels Ultra Turrax (Aufsatz 0,3-3 ml) in 2 x 5 sec homogenisiert und 3 min bei 13000xg bei RT zentrifugiert. Dem Überstand wurden 600 µl 70% Ethanol (in DEPC-Wasser) hinzugefügt und die Probe auf die RNeasy-Säule pipettiert. Nach Bindung der RNA an die Säule durch 15 sec Zentrifugation bei 13000xg (RT), wurde die Säule unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen zunächst mit 700 µl Guanidin-haltigem Waschpuffer und anschließend mit 500 µl Ethanol-haltigem RPE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation für 2 min bei 13000xg (RT), folgte zur Entfernung des restlichen Puffers ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13000xg (RT). Der Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Anschließend wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 13000xg für 1 min (RT) eluiert.

Für die RNA-Isolation aus Kulturzellen wurden 5×10^6 Zellen wie unter 3.2.3.1 beschrieben gewonnen, bei 800xg für 10 min (RT) sedimentiert und der Überstand gründlich entfernt. Die Lyse und Homogenisierung der Zellen erfolgte mit 350 µl β-ME- und GITC-haltigem Lysepuffer. Dem Zelllysats wurden 350 µl Ethanol (70% in DEPC-Wasser) hinzugefügt und die Probe auf die RNeasy-Säule pipettiert. Die weiteren Schritte waren identisch mit der RNA-Isolation aus Gewebe.

Zur Überprüfung der Integrität der RNA und dem Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA, wurden 1 µl des Eluats im 1% Agarosegel (s. 3.2.1.11) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -70°C .

3.2.1.3 Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Isolation der mRNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit dem Oligotex mRNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers und beruht auf dem Prinzip der selektiven Hybridisierung der polyadenylierten Sequenz der mRNA mit einem dT Oligomer.

Mit RNase-freiem Wasser wurden 100 µg Gesamt-RNA auf ein Volumen von 250 µl eingestellt. Nach Zugabe von 250 µl Qiagen-Puffer OBB und 15 µl der auf 37°C erwärmten Oligotex-Suspension, inkubierte die Probe 10 min im Wasserbad bei 70°C und 10 min bei RT. Anschließend wurde die Probe bei 13000xg (RT) 2 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Oligotex-Pellet wurde in 400 µl Waschpuffer OW2 resuspendiert, in die dafür vorgesehene Säule überführt und bei 13000xg (RT) für 60 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde die mRNA mit 50 µl 70°C warmen OEB Puffer über 60 sec eluiert und durch Zentrifugation bei 13000xg (RT) abgetrennt. Aufgrund der geringen Nukleinsäuremenge konnte die mRNA nicht mittels Gelelektrophorese (s. 3.2.1.11) kontrolliert und die Ausbeute nicht quantifiziert werden. Daher wird die Menge im Weiteren in µl des Eluats (Gesamtvolumen 50 µl) aus 100 µg Gesamt-RNA angegeben. Die Aufbewahrung der mRNA erfolgte bei -70°C .

3.2.1.4 Reverse Transkription (RT)

Die RNA wurde mit Hilfe der Omniscript Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Nach Anlagerung des Oligo-dT₁₆ Primers an die RNA, polymerisiert die Transkriptase unter Zugabe von dNTPs eine cDNA von der RNA-Matrize. Zudem verfügt sie über eine RNaseH Aktivität, die zum

Abbau der RNA-Anteile der entstehenden RNA-DNA-Hybride führt. Das Endprodukt ist einzelsträngige cDNA. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler bei 37°C für 60 min. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation bei 95°C über 5 min inaktiviert.

Reaktionsansatz (20 µl): 1X Puffer RT
 1 µM Oligo dT₁₆-Primer
 0,2 mM dNTP-Mix
 4 U Reserve Transkriptase
 1 µg Gesamt-RNA oder 1 µl mRNA aus 100 µg Gesamt-RNA
 (ca. 100 ng)
 ad 20 µl RNase-freies Wasser

3.2.1.5 Isolation von Plasmid-DNA

3.2.1.5.1 Mini-Präparation zur Restriktionsanalyse

Zur Restriktionsanalyse (s. 3.2.1.6) der erzeugten Klone wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterienkolonien durch die Methode der alkalischen Lyse nach BIRNBOIM und DOLY (1979) gewonnen. Am Vorabend wurden die einzelnen Bakterienkolonien jeweils mittels einer 1 ml Pipette von der Agar-Platte gepickt und in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Je 2 ml der Kulturen wurden in einem Eppendorfgefäß bei 13000xg bei 4°C 2 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellpellets wurden in je 100 µl kalter Alkaline lysis solution I suspendiert. Das in der Lösung enthaltene EDTA entfernt Magnesiumionen, wodurch die Stabilität der Zellwand geschwächt wird. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von je 200 µl der Alkaline lysis solution II unterstützt, die das anionische Detergenz SDS enthält. Das Gefäß wurde mehrmals geschwenkt und dann auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 150 µl Kaliumacetat (3 M, pH 5,5) wurde die Lösung neutralisiert, so dass die Plasmide renaturierten, die denaturierte genomische DNA und Proteine jedoch aggregierten. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden diese Aggregate bei 13000xg 5 min bei 4°C abzentrifugiert, während die Plasmid-DNA im Überstand verblieb.

Die Überstände wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße transferiert, mit 900 µl absolutem Ethanol zur Präzipitation der Nukleinsäuren gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 13000xg und RT wurden die Überstände entfernt, die Pellets mit je 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 2 min zentrifugiert. Nach Entfernung des

Überstandes wurden die Gefäße für 10 min zur Trocknung umgekehrt auf ein Papiertuch gestellt. Die Pellets wurden in 30 µl RNase-haltigen (20 µg/ml) EB-Puffer gelöst.

3.2.1.5.2 Mini-Präparation zur Sequenzierung

Nach Auswahl der zu sequenzierenden Klone wurden von den verbleibenden 2 ml der oben beschriebenen Bakteriensuspensionen 10 µl zum Animpfen einer frischen Übernachtskultur verwendet (s. 3.2.1.5.1). Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Mini-Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach alkalischer Lyse der Bakterien, adsorbiert die Plasmid-DNA unter hoher Salzkonzentration an eine Silikat-Gel-Membran, wird gewaschen und dann eluiert.

Die Bakteriensuspension wurde 2 min bei 13000xg bei RT zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets in 250 µl RNase-haltigem Qiagen-Puffer P1 resuspendiert und inkubierten 2 min bei RT. Nach Zugabe von 250 µl des SDS-haltigen Qiagen-Puffers P2 wurde das Gefäß mehrmals invertiert, die Lösung mit 350 µl Qiagen-Puffer N3 neutralisiert und 10 min bei 13000xg (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Silikat-Membran pipettiert, während die präzipitierten Komplexe aus genomischer DNA und Proteinen verworfen wurden. Nach 1 min Zentrifugation bei 13000xg (RT) und Entfernung des Effluats wurde die Membran 2 mal mit je 750 µl des Ethanol-haltigen Qiagen-Puffers PE gewaschen. Nach Transfer in ein neues Eppendorfgefäß wurden 30 µl EB Puffer in das Zentrum der Membran pipettiert und die Plasmid-DNA nach 1 min durch Zentrifugation über 1 min bei 13000xg (RT) im Eluat gewonnen. Die Proben wurden bei –20°C aufbewahrt.

3.2.1.5.3 Midi-Präparation für Transfektionszwecke

Die Isolation der Plasmid-DNA für Transfektionszwecke (s. 3.2.3.4) erfolgte unter Verwendung des Qiagen Plasmid Midi-Kit nach den Angaben des Herstellers. Im Gegensatz zum Qiagen Plasmid Mini-Kit (s. 3.2.1.5.2) wird die Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz gebunden und im Anschluss an die Elution bedarf es einer alkoholischen Präzipitation mittels Isopropanol.

Am Vorabend wurden 100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin mit 100 µl der jeweiligen Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. 30 ml dieser Bakteriensuspension wurden bei 5000xg 15 min bei 4°C sedimentiert und das Pellet mit 4 ml RNase-haltigem Qiagen-Puffer

P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 4 ml SDS-haltigem Qiagen-Puffer P2 und 5 min Inkubation bei RT. Nach Zugabe des eiskalten Qiagen-Neutralisationspuffers P3 inkubierte die Probe 15 min auf Eis und wurde anschließend 30 min bei 15000xg (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule pipettiert, die nach Durchlauf der Probe 2 mal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen wurde. Die in der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Puffer QF eluiert. Zur Fällung der DNA wurde das Eluat mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol versetzt, 30 min bei 15000xg bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Zentrifugationsschritt wurde nach Zugabe von 2 ml 70%iges Ethanol für 10 min wiederholt und nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Pellet unter der Sterilbank 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 150 µl sterilen Aqua bidest. gelöst und in Portionen der Konzentration von 1 µg/µl aliquotiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.2.1.6 DNA Restriktion

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die an doppelsträngiger DNA spezifische Sequenzen erkennen und spalten können, indem sie die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden hydrolysieren. Die Reaktion diente sowohl der Erzeugung von Restriktionsfragmenten zur Rekombination (s. 3.2.1.10.1) von Plasmid-DNA als auch zur Überprüfung einer erfolgreichen Insertion eines DNA-Fragments in die Vektor-DNA (Restriktionsanalyse). Geeignete Restriktionsschnittstellen wurden durch Analyse der DNA-Sequenzen mit dem Programm Map Draw (DNASar Inc., Madison, USA) ermittelt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1X Puffer nach der Empfehlung des Herstellers, dem/n Restriktionsenzym/en (10 U/µg DNA und Schnittstelle), 1 µg/ml BSA (nur im Fall von BamHI, HincII, KpnI, XbaI, XmaI, XhoI), und der Plasmid-DNA. Die Menge der eingesetzten DNA zur Restriktionsanalyse von Plasmiden betrug 100 ng und wurde für eine anschließende Präparation von Restriktionsfragmenten zum Zweck der Ligation auf 1 µg (Vektor-DNA) bzw. 2 µg (PCR-Produkte) erhöht. Für die analytische Restriktion betrug das Volumen des Reaktionsansatzes 10 µl, andernfalls bis zu 40 µl. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler über 60 min bei 37°C (SmaI 25°C) mit anschließender Inaktivierung bei 65°C. Die Restriktionsfragmente wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.1.11).

3.2.1.7 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die “Polymerase Chain Reaction” (PCR) ist eine Methode zur gezielten Amplifikation von DNA-Sequenzen (SAIKI et al. 1985). Durch die Anlagerung sequenzspezifischer Primer und Zugabe von dNTPs wird durch eine hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase) der von den Primern flankierte Abschnitt in mehreren Zyklen (Denaturierung der Doppelstränge, Primeranlagerung und DNA-Synthese) exponentiell amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen wurden auf Basis der Genbankeinträge bzw. Sequenziererergebnisse ausgewählt und mittels der Software PrimerSelect (DNASar Inc., Madison, USA) hinsichtlich Bildung von Dimeren und Loops überprüft.

Reaktionsansatz (50 µl): 1X Reaktionspuffer
 1,5 mM MgCl₂
 0,2 mM dNTP-Mix
 je 20 pmol Forward/Reverse-Primer
 1,25 U Taq-DNA-Polymerase
 1 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl cDNA aus RT-Ansatz (s. 3.2.1.4)
 ad 50 µl Aqua bidest.

Als Negativ-Kontrollen diente der gleiche Ansatz ohne DNA, bzw. mit einer equivalenten Menge der in der RT eingesetzten RNA (s. 3.1.2.4), um auszuschließen, dass PCR-Amplifikate auf Kontaminationen oder genomische DNA zurückzuführen sind. Zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA-Synthese wurde eine PCR mit dem Produkt der RT und G3PDH-Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle diente, soweit verfügbar, eine entsprechende Plasmid-DNA.

Folgendes allgemeines Temperaturprotokoll wurde verwendet:

94°C 2 min, n x [94°C 30 sec, T_m -5°C 30 sec, 72°C 2 min], 72°C 7 min

n = 15 für Mutagenese-PCR

n = 30 für RT-PCR Analyse transfizierter Zelllinien

n = 40 für RT-PCR Analyse der Rattenniere

T_m: siehe 3.1.3

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde eine Touch-down PCR (DON et al. 1991) angewandt. Hierbei wird eine erhöhte Annealingtemperatur in den ersten Zyklen gewählt und in den folgenden Zyklen schrittweise abgesenkt. So können die Primer in den ersten Zyklen in

geringerem Umfang aber hochspezifisch binden und in den folgenden Zyklen mit abgesenkter Annealingtemperatur die bereits amplifzierten Sequenzen als Matrize verwenden.

Temperaturprotokoll für Touch-down-PCR für die unter 4.1.2 verwendeten Primer:

94°C 2 min , 5 x (94°C 30 sec, 61,5°C 30 sec, 72°C 3 min)

10 x (94°C 30 sec, 59,5°C 30 sec, 72°C 3 min)

45 x (94°C 30 sec, 58,0°C 30 sec, 72°C 3 min), 72°C 7 min.

Die Nested-PCR (verschachtelte PCR) ist eine weitere Möglichkeit, die Spezifität zu erhöhen. Waren um das vermeintliche PCR-Produkt im Agarosegel Nebenprodukte erkennbar oder wurden weitere Fragmente amplifiziert, wurde das PCR-Produkt aus dem Agarosegel isoliert (s. 3.2.1.11) und erneut einer PCR unterzogen. In dieser zweiten Reaktion wurde der Forward-Primer durch ein Oligonukleotid ersetzt, welches an einer Position stromabwärts (in 3'-Richtung) des zuvor verwendeten Primers bindet.

3.2.1.8 RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends-PCR)

Die RACE-PCR stellt eine Methode dar, die es ermöglicht, die 3'- und 5'- Enden einer cDNA zu amplifizieren (FROHMAN et al. 1988). Im Gegensatz zu der Amplifikation von internen Bereichen einer cDNA durch PCR mittels zweier flankierender Primer werden hier die Enden der cDNA zuvor mit Adaptorsequenzen ligiert. Die 3'-RACE- und 5'-RACE-PCR werden getrennt voneinander mit dem jeweiligen Adaptorprimer und einem genspezifischen Forward- bzw. Reverse-Primer durchgeführt. Durch Subklonierung dieser sich in Richtung des genspezifischen Primers überlappenden Fragmente ist es möglich, einen full-length Klon zu erstellen.

Für die 3'-RACE wurde bei der Reversen Transkription von 2 µl mRNA (s. 3.1.1.4) statt des Oligo dT₁₆ Primers der GeneRacer Oligo dT (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Dieser weist zusätzlich eine Adaptorsequenz auf, die dann als Matrize für den in der 3'-RACE-PCR einzusetzenden Gene Racer Adaptorprimer dient.

Das 5'-Ende wurde mittels des Marathon Amplifikation Kit nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Hierbei erfolgte nach der Erststrangsynthese (ESS) eine Zweitstrangsynthese (ZSS) und schließlich die Adaptorligation (AL) nach folgenden Protokollen:

	Reaktionansatz	Inkubation
ESS:	2 µl mRNA (s.3.2.1.3)	
	1 µl cDNA Syntheseprimer (10 µM)	
	3 µl RNase freies Wasser;	<u>2 min 70°C, 2 min Eis</u>
	2 µl 5X First-Strand Puffer	
	1 µl dNTP-Mix (10 mM)	
	1 µl RNase freies Wasser	
	1 µl AMV Reverse Transkriptase (20U/µl);	<u>1 h 42°C</u>
ZSS:	48,4 µl RNase freies Wasser	
	16 µl 5X Second-Strand Puffer	
	1,6 µl dNTP-Mix (10 m)	
	4 µl 20X Second-Strand Enzym-Cocktail;	<u>90 min 16°C</u>
	2 µl T4-DNA- Polymerase (5U/µl);	<u>45 min 16°C</u>
	2 µl EDTA-Glykogen-Mix	

Das Reaktionsprodukt wurde zunächst mit 100 µl PCI 25:24:1 (Vol%) versetzt und 10 min bei 13000xg (RT) zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde daraufhin mit 100 µl CI 24:1 (Vol%) gemischt und erneut 10 min bei 13000xg (RT) zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde mit dem 0,5fachen Volumen Ammoniumacetat (4M) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol (96 %) 20 min bei 13000xg (RT) präzipitiert, das Präzipitat mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich unter der Sterilbank 10 min luftgetrocknet, in 10 µl sterilem Aqua bidest. gelöst und für die Adaptorligation (AL) eingesetzt.

AL:	5 µl DNA-Lösung	
	2 µl Marathon-Adaptor (10 µM)	
	2 µl 5X Ligationspuffer	
	1 µl T4-DNA-Ligase (400U/µl);	<u>1h RT, 12 h 16°C, 5 min 70°C</u>

Die doppelsträngige adaptorligierte cDNA wurde 1:250 mit Tris-EDTA Puffer verdünnt, zur Denaturierung der Doppelstränge 5 min auf 70°C erhitzt und bei -20°C aufbewahrt. Für die

darauffolgende PCR wurden 5 µl der Verdünnung eingesetzt, wobei der ligierte Adaptor als Matrize für den eingesetzten Adaptorprimer1 (AP1) diene.

3.2.1.9 Sequenzanalyse und Vorhersage von Proteinstrukturen

Die Sequenzierung wurde unter Verwendung von 1 µg Plasmid-DNA (s. 3.2.1.5.3) in Auftragsarbeit vom IZKF Leipzig, Core Unit DNA-Technologien, Dr. Krohn durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Genbankeinträgen über BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder mit eigenen Sequenzierungsergebnissen mittels MegAlign 5.06 (DNASar, Inc., Madison, USA) unter Verwendung des Clustal W Algorithmus verglichen. Die Identifizierung von Exon-Intron-Grenzen erfolgte unter Einbeziehung der GT-AG-Regel. Der längste offene Leserahmen wurde über Edit Sequence 5.06 (DNASar) ermittelt und die DNA-Sequenz in das mögliche Translationsprodukt umgeschrieben. Die Vorhersage der Topologie, der Sekundärstrukturen und der Transmembrandomänen der möglichen Proteine erfolgte mittels Protean 5.06 (DNASar), TMPred (unter http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) nach HOFMANN und STOFFEL (1993) und Toppred II (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) unter Verwendung des Heijne Algorithmus (VON HEIJNE 1992) sowie der Methode nach Kyte-Doolittle (KYTE und DOOLITTLE 1982).

3.2.1.10 Klonierung

3.2.1.10.1 Ligation

Ligation von Restriktionsfragmenten

Bei der Ligation von Restriktionsfragmenten (s. 3.2.1.6) wurden die DNA-Fragmente (Insert und Vektor) mittels der T4-DNA-Ligase ligiert. Wurde der Vektor nur an einer Schnittstelle restringiert, wurde eine Religation durch Dephosphorylierung der Restriktionsschnittstelle, unterbunden. Dazu wurden dem Ansatz nach der Restriktion 1 µl CIP (10U/µl), 1 µl EcoRI-Puffer und 8 µl Aqua bidest. hinzugefügt. Die Reaktion wurde im Thermocycler bei 37°C für 1h durchgeführt und das Enzym anschließend bei 65°C für 20 min inaktiviert.

Die Ligation erfolgte bei 16°C über 2 h in einem 10 µl Ansatz. Eingesetzt wurden 50-100 ng des Vektors (pIRES, pEGFP, pCR3.1), das Insert im molaren Überschuss von 3:1, 4 U T4-DNA-Ligase und 1 µl des 10X Ligase-Puffers. Zwei und 4 µl des Ligationsansatzes wurden

zur Transformation (s. 3.2.1.10.3) eingesetzt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne Insert, um den Anteil an religierten Vektor zu eruieren und ein Ansatz ohne Ligase, um den Anteil an ungeschnittenem Vektor zu bestimmen.

Ligation von PCR-Produkten

Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte über eine sog. TA-Klonierung. Für die PCRs wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet (s. 3.2.1.7), die in den Elongationszyklen ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende amplifizierter DNA-Fragmente anfügt. Der Vektor hingegen besitzt in seiner multiple cloning site eine geöffnete Insertionsstelle, die jeweils an den 3'-Enden ein überhängendes Thymidin aufweist. Die PCR-Produkte wurden mittels der Kits Topo TA Cloning Kit pCR4 und pSTBlue-1 Acceptor Vektor Kit nach den Angaben des Herstellers im molaren Verhältnis Vektor:Insert von 1:2 ligiert.

Beim Topo TA Cloning Kit pCR4 bestand der Ligationsansatz (6 µl) aus bis zu 4 µl PCR-Produkt, 1 µl 10X Inkubationspuffer (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und 1 µl Vektor (50 ng/µl). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden 2 µl des Ansatzes für die Transformation verwandt. Beim pSTBlue-1 Acceptor Vektor Kit wurden zu einem Gesamtvolumen von 10 µl 1 µl Vektor (50 ng/µl), 5 µl Clonables 2 x LigationsPremix und bis zu 4 µl PCR-Produkt pipettiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden nach 1,5 h bei 16°C zur Transformation verwandt. Gegebenenfalls wurde zum Erreichen der Volumina (6 µl bzw. 10 µl) Nuklease-freies Wasser ergänzt.

3.2.1.10.2 Herstellung kompetenter Zellen

Als kompetente Zellen werden Bakterien bezeichnet, die befähigt sind, Plasmid-DNA aufzunehmen. Hierzu wurden 20 ml LB-Medium mit 100 µl Bakteriensuspension (*E.coli* XL-1- Blue) angeimpft und bei 37°C und 200 rpm 5 h geschüttelt. Von der Starterkultur wurden 2 ml in 100 ml LB-Medium unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (ca. 3 h) propagiert. Die Bakterienkultur wurde bei 1500xg 10 min bei 4°C zentrifugiert, das Sediment in 5 ml TSS-Medium resuspendiert, in Aliquots zu 200 µl portioniert und bei -70°C eingefroren.

3.2.1.10.3 Transformation kompetenter Zellen

Zur Übertragung von Plasmid-DNA in die Bakterienzellen wurden 2 und 4 µl der Ligationsansätze bzw. der Ligationskontrollen (s. 3.2.1.10.1) zu 200 µl kompetenten Bakterienzellen pipettiert. Als Transformationskontrolle diente 1 ng ringförmige Plasmid-DNA. Die Transformationsansätze inkubierten 30 min auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 30 sec und einer anschließenden Inkubation für 3 min auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) wurden die Zellen 60 min bei 200 rpm geschüttelt. LB-Agar wurde in der Mikrowelle verflüssigt und nach dem Abkühlen mit der vektorabhängigen Antibiotika-Stammlösung (0,1 g/ml in Aqua bidest., steril filtriert) versetzt. Die Vektoren pCR4, pCR3.1 und STBlue1 vermitteln die Resistenz gegenüber Ampicillin, die Vektoren pIRES und pEGFP gegenüber Kanamycin. Pro Petrischale wurden 15 ml des Antibiotika-haltigen LB-Agars (Ampicillin 50 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml) verwandt und 50 µl, 100 µl und 150 µl des Transformationsansatzes mittels eines Drigalski Spatel ausgestrichen. Die Platten inkubierten bei 37°C über Nacht.

Bei Verwendung des pSTBlue-1 Acceptor Vektor Kit, welches ein Blue/White-Screening der Bakterienkolonien ermöglicht, wurden dem Agar 70 µg/ml X-GAL (Stammlösung 20 mg/ml in Dimethylformamid) und 80 µM IPTG (Stammlösung 1M in Aqua bidest.) hinzugefügt. Durch den Einbau des Inserts in das lacZ Gen, welches für die α-Unterheit der β-Galactosidase codiert, kann dieses nicht mehr expremiert werden. Durch Zugabe des Substratanalogons X-Gal färben sich die Zellen, die kein Insert tragen aufgrund der β-Galactosidase-Aktivität dunkelblau, während die Insert tragenden Zellen ungefärbt bleiben.

3.2.1.11 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

RNA, PCR-Produkte, Plasmid-DNA und Restriktionsfragmente wurden im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung und unterschiedlichen Größen in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der in Nukleinsäuren interkaliert und dann unter UV-Licht (366 nm) orange-rot fluoresziert.

Bei der Herstellung des Agarosegels war der Anteil an Agarose abhängig von den zu erwarteten Produktgrößen (< 500 bp: 1,5%, 500-1000 bp:1%, >1000 bp: 0,7%). Die Agarose wurde im 0,5X TBE-Puffer (mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) in der Mikrowelle verflüssigt,

nach Abkühlung (50-60°C) in den Gelelektrophoreseschlitten gegossen und dieser nach Erstarren der Agarose in die mit 0,5X TBE-Puffer (0,5 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Fünf µl Probe wurden mit je 1 µl Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau und 30% Glycerol in 6X TBE) versetzt und aufgetragen. Die Auswahl des Größen-Markers richtete sich nach den zu erwartenden Fragmentgrößen. Die Auftrennung erfolgte bei 5V/cm Laufstrecke für 40 min. Die Laufzeit wurde bei der Auftrennung mehrerer Produkte in einer Probe auf bis zu 90 min erhöht.

3.2.1.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA aus dem Agarosegel (s. 3.2.1.11) wurde das QIAquick Gel-Extraktionskit nach den Angaben des Herstellers verwandt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde unter abgeschwächtem UV-Licht im Agarosegel markiert, ohne UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Durch Zugabe des 3fachen Volumens des Puffers QG wurde die Agarose in 10 min bei 50°C aufgelöst. Die Adsorption der DNA an die Silikat-Membran in einer Säule erfolgte nach dem Hinzufügen des 1fachen Volumens Isopropanol durch Zentrifugation für 1 min bei 13000xg (RT). Unter gleichen Zentrifugationsbedingungen wurde die Säule 2x mit 750 µl Puffer PE gewaschen und die DNA mit 50 µl Puffer EB eluiert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE wird ein Proteingemisch entsprechend der unterschiedlichen Proteingrößen im elektrischen Feld aufgetrennt. Trenngel und Sammelgel setzten sich aus folgenden

Komponenten zusammen:	Trenngel (12%)	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 0,8%)	4 ml	0,67 ml
Trenn-bzw.Sammelgelpuffer	2,5 ml	1,25 ml
Aqua bidest.	3,45 ml	3,05 ml
APS 10%	50 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Das Trenngel polymerisierte 45 min, bis es mit dem Sammelgel überschichtet werden konnte, welches ebenfalls 45 min polymerisierte. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) eingespannt.

Die Zellen einer T75 Kulturflasche wurden mit Trypsin abgelöst (s. 3.2.3.1), in 6 ml Medium resuspendiert und 5 min bei 800xg (4°C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% SDS, pH 7,4) denaturiert. Die DNA im stark viskösen Lysat wurde mit einer Kanüle von 5 mm Durchmesser geschert. 6-20 µl der Proben und 5 µl des Proteinmarkers IV wurden in die Taschen des SDS-Gel eingegeben. Die Laufzeit betrug 90 min bei 15 V/cm Laufstrecke.

3.2.2.2 Nachweis von Proteinen im Westernblot

Zum spezifischen Nachweis von Zellproteinen, wurden die über SDS-PAGE (s. 3.2.2.1) aufgetrennten Proteine mittels eines elektrischen Feldes unter Beibehaltung ihrer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran (PVDF-Membran) transferiert. Die immunologische Analyse erfolgte über Primärantikörper, die in einem zweiten Schritt mit Enzym-Antikörper gekoppelt wurden.

Die PVDF-Membran wurde zusammen mit dem Blottingpapier 30 min im Transferpuffer equilibriert. Für den Transfer wurde die Elektroden der Semi-Dry-Blottingkammer mit Transferpuffer befeuchtet und von der Anode ausgehend 9 Blottingpapiere, die mit Methanol benetzte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und weitere 9 Blottingpapiere geschichtet. Der Transfer erfolgte über 90 min bei 0,8 mA/cm² Membranfläche. Zum Absättigen der verbleibenden Bindungskapazität wurde die PVDF-Membran über Nacht in 25 ml Blockierlösung (1% BSA in TBST) bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-HA) wurde 1:3000 in der Blockierlösung verdünnt und die Membran mit 2 ml dieser Lösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei RT wurde die Membran dreimal für je 10 min in 50 ml TBST gewaschen. Der AP-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1:2000 in der Blockierlösung verdünnt. Die Membran inkubierte mit 4 ml dieser Lösung 1 h bei RT, wurde ebenfalls dreimal für je 10 min in 50 ml TBST gewaschen und anschließend unter Leitungswasser abgespült. Für die Nachweisreaktion wurden 2 ml der Entwicklerlösung Western Blue Stabilized Substrate for AP unter Lichtausschluss für 10 min auf die Membran aufgetragen. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran mit Leitungswasser abgestoppt.

3.2.2.3 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Lowry

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach LOWRY et al. (1951) beruht auf 2 Reaktionen. Im ersten Schritt werden in alkalischer Lösung durch Bildung eines Komplexes mit Peptidbindungen Kupferionen reduziert. Diese katalysieren die Oxidation aromatischer Aminosäuren bei gleichzeitiger Reduktion der Folinreagenz. Unter der Bildung von Mischoxiden erfolgt eine blaue Färbung der Lösung, die mit Hilfe einer Eichreihe in Proteingehalt umgerechnet werden kann. 100 µl der Zellsuspension aus 3.2.3.8 wurden bei -20°C eingefroren und am nächsten Tag bei Raumtemperatur aufgetaut. Die dadurch lysierten Zellen wurden kräftig gevortext und 1:10 mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (KPP) verdünnt. Für die Eichreihe wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (0-1 mg in KPP) hergestellt. Zu je 25 µl der Verdünnung bzw. der Eichreihe wurden 750 µl der Lowry-Lösung 3 pipettiert, der Ansatz gut gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 37,5 µl Folin-Reagenz und Inkubation für 40 min bei RT, erfolgte die Messung der Adsorption im Photometer bei 660 nm gegen einen Nullwert (KPP).

3.2.3 Zellkulturmethoden

3.2.3.1 Kultivierung

Die verwendeten Zellkulturlinien HPCT-1E3, COS-1 und MDCK wurden in 12 ml ihres entsprechenden Mediums (s. 3.1.6) in 75 cm² Kulturflaschen (T75) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert und bei Konfluenz von 80% (HPCT) bzw. 90-100% (MDCK, COS-1) passagiert. Hierzu wurden die Zellen 2x mit je 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA für 1-3 min bei 37°C unter Carbogen (5%) abgelöst. Durch Resuspension in 10 ml Kulturmedium wurde die Reaktion abgestoppt. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde zur Zellzahlbestimmung in die Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) eingegeben. Vier Quadrate wurden ausgezählt, deren Mittelwert x 10⁴ die Zellzahl/ml ergibt. Zur Weiterführung der Kultur wurden ca. 1,2 x 10⁶ Zellen mit frischem Medium in eine neue T75 überführt.

3.2.3.2 Überprüfung der Zellvitalität mit Trypanblau

Die Zellvitalität wurde durch Anfärbung mit Trypanblau bestimmt, das intakte Zellmembranen nicht durchdringt, membrangeschädigte Zellen jedoch blau anfärbt. Hierzu wurden 45 µl einer Zellsuspension mit 5 µl 1%igem Trypanblau in PBS gemischt und mikroskopisch ausgewertet.

3.2.3.3 Kryokonservierung

Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Zur Herstellung des Einfriermediums wurden zu 40 ml des jeweiligen Zellkulturmediums (s. 3.1.6) 5 ml FKS und 5 ml DMSO hinzugegeben und die Mischung sterilfiltriert.

Zu konservierende Zellen wurden bei 800xg 5 min bei 4°C zentrifugiert und in 1 ml/5x10⁶ Zellen eiskaltem Kryomedium resuspendiert. Die Suspension wurde zunächst bei -70°C eingefroren und nach 1-5 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C angetaut und sofort in 10 ml warmen Kulturmedium resuspendiert.

3.2.3.4 Transfektion von Zelllinien

3.2.3.4.1 Stabile Transfektion mittels PEI

Der stabile Einbau von Fremd-DNA in das Wirtgenom der Zelllinien erfolgte unter Verwendung der Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI). Zur anschließenden Selektion wurden die Zellen im G418-haltigen Medium in der zuvor ermittelten notwendigen Konzentration von 400 µg/ml kultiviert. Stabil transfizierte Zellen sind aufgrund des resistenzvermittelnden Gens des Plasmids resistent gegenüber dem G418, auf die nicht stabil transfizierten Zellen wirkt G418 toxisch.

Am Vortag der Transfektion wurden 3,5 x 10⁶ Zellen (MDCK, COS-1) in einer T75-Flasche ausgesät, die bis zum Zeitpunkt der Transfektion eine zu 60% konfluente Zellschicht bildeten. Je T75-Flasche wurden 5 µg Plasmid-DNA in 0,5 ml sterilen Aqua bidest. verdünnt, mit 5 µl PEI (10 mg/ml in Aqua bidest.) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4,5 ml DMEM (serumfrei) inkubierten die Zellen in diesem Transfektionsmedium 4h bei 37°C

unter Carbogen (5%). Nachfolgend wurde das Transfektionsmedium durch 12 ml Kulturmedium ersetzt (s. 3.1.6). Die Zellen wurden nach 24 h 2x mit je 10 ml PBS gewaschen und fortan in 12 ml G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 1-2 d über 2-3 Wochen bis zum Abschluss der Selektion.

3.2.3.4.2 Selektion stabiler Einzelzellklone

Zur Selektion von Einzelzellklonen wurden 100 stabil transfizierte Zellen (s. 3.2.3.4.1) auf einer Zellkulturschale (Durchmesser 9,4 cm) in 10 ml Selektionsmedium (400 µg G418/ml Medium) kultiviert. Nach 7 d wurden vereinzelt gewachsene Zellkolonien mit Trypsin benetzten Filterpapieren (Durchmesser 0,4 mm) gewonnen und in 24-well Platten mit 2 ml/well Selektionsmedium überführt und weiter kultiviert. Zur Subklonierung wurden 50 Zellen/well auf eine 96-well Platte ausgesät und in 25 µl/well Selektionsmedium kultiviert. Nur solche Klone wurden weiter verwendet, die sich aus genau einer Zelle entwickelten.

3.2.3.4.3 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion der Zelllinien erfolgte mittels der Transfektionsreagenzien GeneJuice und Nanofectin I. Am Vortag wurden auf sterilen Deckgläschen in einer 24-well Platte 60.000 (COS-1) bzw. 90.000 (MDCK, HPCT-1E3) Zellen/well ausgesät, die bis zum Zeitpunkt der Transfektion eine zu 60% konfluente Zellschicht bildeten. Die effizientesten Transfektionsbedingungen wurden mit dem unmodifizierten Expressionsvektor pEGFP-C2 ermittelt. Im Fall von GeneJuice wurde die DNA Menge von 0,1, 0,25 und 0,5 µg/well, sowie das w/v Verhältnis DNA zu GeneJuice zwischen 1:3, 1:4 und 1:5 µg/µl variiert. Das beste Ergebnis wurde mit einer DNA Menge von 0,5 µg/well in einem Verhältnis von 1:3 erzielt. Pro well wurden 1,5 µl GeneJuice mit 23 µl DMEM (serumfrei) 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) und Inkubation für 10 min (RT), wurde der Ansatz mit Kulturmedium auf ein Volumen von 200 µl ergänzt. Im Fall von Nanofectin I wurden DNA Mengen von 0,25, 0,5 und 1 µg/well, sowie DNA/Nanofectin-Verhältnisse von 1:2, 1:3,2 und 1:4 µg/µl getestet. Am effizientesten erwies sich die DNA-Menge von 1 µg/well bei einem Verhältnis von 1:3,2. Pro well wurde 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) in 195,8 µl DMEM (serumfrei) mit 3,2 µl Nanofectin I gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des jeweiligen Transfektionsansatzes (200 µl) zu 0,3 ml/well Kulturmedium (s. 3.1.6) inkubierten die Zellen 4 h bei 37°C unter Carbogen (5%). Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit je

1 ml des jeweiligen Kulturmediums durchgeführt. Bei Transfektion mit GFP-Fusionskonstrukten wurden die Deckgläschen nach 24 h, 48 h und 72 h eingedeckt (s. 3.2.3.5) und mikroskopiert. Andernfalls wurde die Genexpression nach 48 h über indirekte Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.3.5) nachgewiesen.

3.2.3.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Stabil transfizierte MDCK-Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in einer 24-well Platte ausgesät (30000/well) und 3 d kultiviert. Transient transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion analysiert. Nach 2x Waschen mit je 1 ml PBS wurden die Zellen mit je 1 ml 2%igen PFA für 10 min bei RT fixiert, mit PBS gewaschen, für 10 min in NH_4Cl (50 mM) bei RT inkubiert und schließlich mit je 1 ml 0,1% Triton-X-100 für 10 min bei RT permeabilisiert. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubierten die Zellen in 1% BSA in PBS 1 h bei 4°C.

Der Primärantikörper (Monoclonal Anti-HA bzw. Polyclonal Anti-HA) wurde in 1% BSA in PBS 1:200 verdünnt und zu 200 μl /well über 1 h bei RT aufgetragen. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit je 1 ml PBS gewaschen. Der konjugierte Sekundärantikörper wurde mit 1% BSA in PBS verdünnt (AntiMouse-IgG-FITC:1:300, AntiRabbit-IgG-RP-E: 1:200) und inkubierte mit den Zellen 1 h unter Lichtausschluss bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBS für 5 min wurden die Deckgläschen kurz mit Aqua bidest. gespült, mit je 1 Tropfen FluorSave Reagenz eingedeckt und 1 h unter Lichtausschluss bei RT getrocknet. Mit GFP-Konstrukten transfizierte Zellen wurden lediglich gewaschen, fixiert und anschließend sofort eingedeckt.

3.2.3.6 Messung der Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat

In Kulturschalen (Durchmesser 9,4 cm) wurden 1×10^6 MDCK-Zellen ausgesät und 3 d in Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden 2x mit je 10 ml PBS gewaschen, inkubierten 3 min mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C und wurden mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspensionen von jeweils 3 Kulturschalen wurden in einem 25 ml Erlenmeyerkolben zusammengeführt und 20 min bei 37°C unter Carbogen (5%) auf einem Schwenktisch inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit wurde die Zellvitalität mittels Trypanblau überprüft (s. 3.1.3.2). Die Zellsuspensionen wurden zweimal in 2 ml Eppendorfgefäßen 4 sec bei 4200 x g (RT) sedimentiert und nach Entfernung des Überstandes in 1 ml Tyrode-Puffer

(37°C unter 5% Carbogen, pH 7,4) resuspendiert. Nach einer dritten Zentrifugation wurden die Zellsuspensionen jeweils auf ein Volumen von 1,3 ml mit dem Tyrode-Puffer eingestellt, wovon 100 µl der Zellsuspension abgenommen und zur Bestimmung des Proteingehalts (s. 3.1.2.1) verwendet wurden.

Die Zellsuspensionen (1,2 ml) wurden in 25 ml Erlenmeyerkolben überführt, die im Wasserbad bei 37°C unter Carbogen (5%) über die gesamte Versuchsdauer geschwenkt wurden. Nach 10-minütiger Equilibration erfolgte die Zugabe von je 12 µl des sog. Heiß-Kalt Gemisches aus $^3\text{[H]}$ -Mtx/Mtx (s. 3.1.6). Dies entspricht einem Einsatz von $2,4 \times 10^5$ dpm $^3\text{[H]}$ -Mtx und 5 µM Mtx. Aliquots von 100 µl der Probe wurden nach definierten Zeitabständen $t = 0,25, 0,45, 0,75, 1,25, 3, 5, 10$ und 20 min in 400 µl Zentrifugenröhrchen pipettiert und 9 sec bei 10.600xg (RT) zentrifugiert. Die Röhrchen enthielten 50 µl 4M KOH und 150 µl eines Gemisches aus Silikonöl 200 und Silikonöl 20 (3:1 v/v), wodurch sich eine deutliche Trennung von Inkubationsmedium oberhalb der Silikonölphase und dem Zellpellet in der unteren KOH-Phase ergab. Nachdem die Zellen durch Inkubation in der KOH-Phase über Nacht bei RT lysiert waren, wurden die Zentrifugenröhrchen in Höhe der Silikonölphase durchtrennt und das Zelllysate sowie der Überstand der ersten 3 Proben mit je 3 ml Szintillationslösung 12 h bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung der Radioaktivität der Proben erfolgte mittels Flüssigkeitsszintillationszählung über 4 min im Beckman LS 6500.

Die Bestimmung der Aufnahme von Methotrexat in pmol/mg Protein beruhte auf dem Verhältnis von aufgenommener zu eingesetzter Radioaktivität in dpm. Dabei wurde die spezifische Aktivität des Substrates und die Menge an Kaltsubstanz berücksichtigt.

Die Berechnung erfolgte mittels folgender Formel (Persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Walther Honscha, Leipzig, Juni 2002):

$$\left(\frac{\sum dpm}{SA * 2,22 \times 10^{12}} + \frac{K}{10^4} \right) * \left(\frac{dpmz * 10}{\sum dpm * P} \right) = \text{Aufnahme in Mol/mg Protein}$$

$\sum dpm$ = dpm Überstand + dpm Zelllysate

SA = spez. Aktivität in Ci/Mol

K = Kaltsubstanz in Mol/l

dpmz = dpm Zelllysate

P = Proteingehalt in mg/ml

Die Mittelwerte von 4 Einzelmesswerten \pm Standardabweichung (SD) wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot (SPSS Inc.) graphisch dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Molekularbiologische Charakterisierung alternativer Splicing-Varianten des MTX-Carriers (rRfc) der Rattenniere (RK-MTX)

4.1.1 Nachweis, Klonierung und Sequenzierung neuer cDNA-Fragmente

Zum Nachweis möglicher Splicing-Varianten des MTX-Carriers in der Niere wurde die mRNA aus der Rattenniere isoliert und die cDNA mittels Reverser Transkription (RT) für die anschließende PCR gewonnen. Das Primerpaar RK-MTX-746F/RK-MTX-1222R wurde auf Grundlage der bekannten Lokalisation der Insertion von 203 bp der cDNA des MTX-2 aus der Rattenleber (RL-MTX-2) konstruiert. Bei Verwendung dieses Primerpaars ist die Insertion des MTX-2 in dem zu amplifizierenden Abschnitt eingeschlossen. Hieraus ergeben sich unterschiedliche PCR-Produktgrößen für den MTX-1 und MTX-2. Für den MTX-1 errechnet sich eine PCR-Produktgröße von 477 bp und für den MTX-2 aufgrund der Insertion (203 bp) eine PCR-Produktgröße von 680 bp. Bei Anwendung der PCR-Standardbedingungen mit 25 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 56°C konnte jedoch nur ein Fragment geleelektrophoretisch nachgewiesen werden. Dieses entsprach hinsichtlich des Molekulargewichts der bekannten Splicing-Variante MTX-1. Daher wurde die Zyklenzahl schrittweise von 25 auf 40 Zyklen erhöht und die Annealing-Temperatur von 56°C auf 54°C gesenkt. Unter diesen optimierten PCR-Bedingungen konnten in der Geleelektrophorese vier DNA-Fragmente unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt werden (Abb. 4).

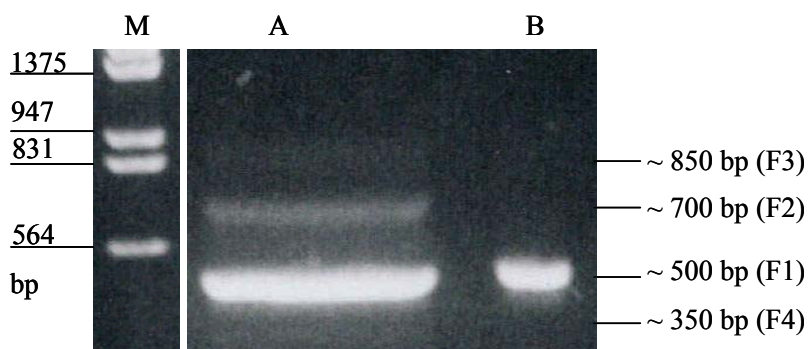


Abb. 4: Amplifikation von Fragmenten möglicher Splicing-Varianten des RK-MTX

Mittels RT-PCR wurden mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-1222R bei einer Annealing-Temperatur von 54°C in 40 Zyklen aus der mRNA der Rattenniere 4 DNA-Fragmente (F1-4) unterschiedlichen Molekulargewichts amplifiziert und im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Längenstandard DNA Sizer III [M], Nieren cDNA (15 µl des PCR-Produkts) [A], Positivkontrolle RK-MTX-1 Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 477 bp [B]

Die am stärksten ausgeprägte Bande mit einer Produktgröße von ca. 500 bp befand sich auf gleicher Höhe mit der des PCR-Produkts der Positivkontrolle RK-MTX-1 (Fragment 1). Neben einer deutlichen Bande höheren Molekulargewichts mit ca. 700 bp (Fragment 2), ließ sich noch eine schwache Bande mit ca. 850 bp (Fragment 3) und eine sehr schwache Bande mit ca. 350 bp abgrenzen (Fragment 4).

Die 4 DNA-Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und mittels TA-Cloning in den Vektor pCR4 eingefügt. Zur Überprüfung der erfolgten Insertion der Fragmente in den Vektor wurde eine Restriktionsanalyse mit EcoRI durchgeführt, dessen 2 Rekognitionssequenzen in der sog. „multiple cloning site“ (mcs) des Vektors das potentielle Insert flankieren. Für jede restringierte Plasmid-DNA ergab sich genau ein Restriktionsfragment, mit dem sich die Insertion bestätigte und ausgeschlossen werden konnte, dass es in den klonierten Fragmenten eine weitere Schnittstelle für EcoRI gab. Die Restriktionsfragmente der klonierten Fragmente 1, 2 und 4 entsprachen denen der PCR-Produkte von ca. 500 bp, 700 bp und 350 bp. Die Restriktionsfragmente 8 verschiedener Klone des Fragments 3 (ca. 850 bp) wiesen hingegen keine einheitliche Fragmentgröße auf und waren < 850 bp. Neben 5 DNA-Fragmenten einer Größe von ca. 700 bp, und je einem von ca. 500 bp bzw. ca. 350 bp, wies ein weiteres Fragment eine Größe von ca. 800 bp auf (Abb. 5).

Repräsentative Klone aller RT-PCR Produkte wurden sequenziert und mit den bekannten Sequenzen der cDNAs des RK-MTX-1 und RL-MTX-2 abgeglichen.

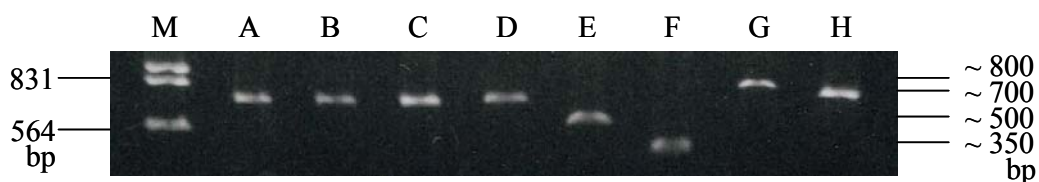


Abb. 5: Restriktionsfragmente verschiedener Klone von Fragment 3

Das Fragment 3 (~ 850 bp) wurde in den Vektor pCR4 eingefügt. Anschließend wurden die mit EcoRI restringierten Plasmide A-H des Fragments 3 im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Erfasst wurden Restriktionsfragmente mit Größen von 700 bp [A-D, H], >700 bp [G], 500 bp [E] und 350 bp [F]. Als Längenstandard diente der Marker DNA Sizer III [M].

Fragment 1

Die Sequenzierung des Fragments 1 (477 bp) ergab eine 100% Homologie zum Sequenzabschnitt von nt 746 – nt 1222 der cDNA des RK-MTX-1. Damit wurde das Fragment 1 der Splicing-Variante 1 (MTX-1) zugeordnet.

Fragment 2

Das Fragment 2 (680 bp) wies im Vergleich zur cDNA des MTX-1 eine Insertion von 203 bp auf. Diese Insertion ist identisch mit der der aus der Leber klonierten cDNA des MTX-2. Sie beginnt im Anschluss mit nt 1032 (nt 1032 - nt 1234) und führt nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens. Das Fragment 2 wurde demnach der Splicing-Variante 2 (MTX-2) zugeordnet.

Fragment 3

Nach der Restriktion der Klone von Fragment 3 wiesen die Restriktionsfragmente unterschiedliche Produktgrößen von ca. 350- ca. 800 bp auf. Zwei Klone mit der Fragmentgröße von ca. 700 bp und der Klon mit der Fragmentgröße von ca. 800 bp wurden sequenziert. Im Ergebnis stellte sich heraus, dass alle 3 Fragmente 680 bp mit einer 100%igen Homologie zum Fragment 2 aufwiesen. Demzufolge ließ sich durch die Sequenzierung kein PCR-Produkt von ca. 850 bp bestätigen. Zur weiteren Analyse wurde das aus dem Gel extrahierte DNA-Fragment 3 (ca. 850 bp) in einer PCR mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-1222R unter den vorhergehenden Bedingungen (Annealing-Temperatur 54°C, 40 Zyklen) direkt amplifiziert.

Neben der erwarteten Bande von ca. 850 bp wurden 4 weitere Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt. In abnehmender Intensität entsprachen sie den Produktgrößen der in der RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente von 500 bp, 700 bp, 850 bp und 350 bp. Zusätzlich ergab sich ein zuvor nicht aufgetrenntes PCR-Produkt mit einer Produktgröße von ca. 1400 bp, das in seiner Intensität dem Produkt von ca. 850 bp entsprach (Abb. 6).

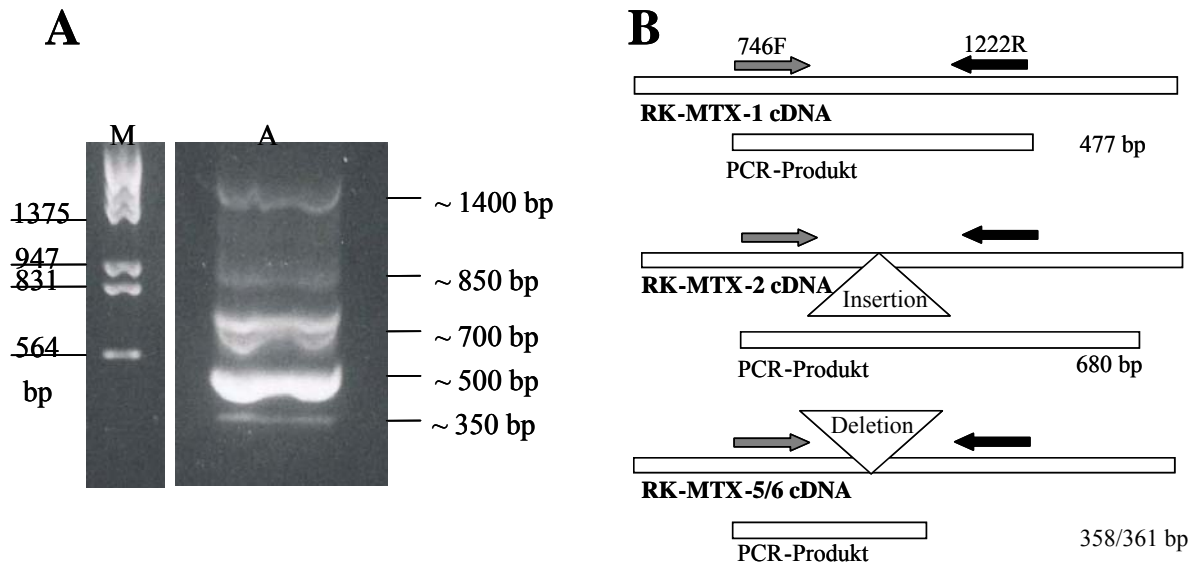


Abb. 6: PCR-Analyse von Fragment 3

A) Das Fragment 3 (~ 850 bp) der RT-PCR aus Abb.1 wurde aus dem Gel extrahiert und mittels PCR mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-1222R bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C in 40 Zyklen erneut amplifiziert. Im 1%igen Agarosegel wurden 5 Amplifikate unterschiedlicher Größe aufgetrennt [A]. Als Längenstandard diente der Marker DNA Sizer III [M].

B) Lokalisation der Primer und die resultierenden PCR-Produkte der cDNA-Varianten RK-MTX-1 (477 bp), RK-MTX-2 (+203 bp) und RK-MTX-5/6 (- 119/116 bp).

Um eine Verunreinigung der Probe von 850 bp mit den anderen Amplifikaten der RT-PCR bei der Isolierung auszuschließen, wurde das DNA-Fragment der Bande bei ca. 850 bp erneut aus dem Gel isoliert und in eine PCR mit den Primern RK-MTX-794F und RK-MTX-1222R (Nested-PCR) eingesetzt. Gleichmaßen wurde mit dem DNA-Fragment des PCR-Produkts mit ca. 1400 bp verfahren.

Statt einem Amplifikat der jeweiligen Produktgröße von ca. 850 bp bzw. 1400 bp, wurden in beiden Ansätzen jeweils 3 DNA-Fragmente mit den Produktgrößen von ca. 500 bp, 700 bp und 350 bp amplifiziert (Abb. 7). Damit ließen sich RT-PCR-Produkte eines möglichen MTX-3 und MTX-4 der Größe von 850 bp und 1400 bp nicht bestätigen.

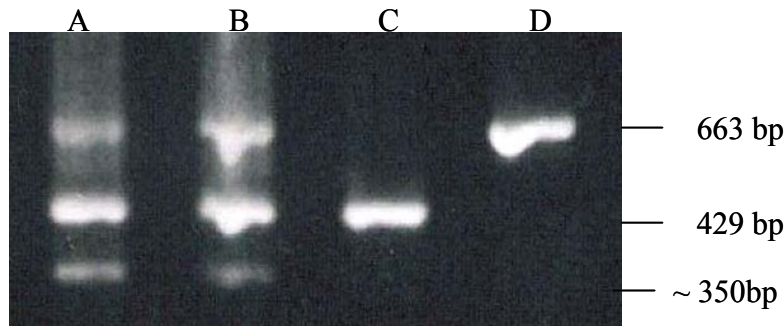


Abb. 7: Nested-PCR mit den Fragmenten der Größe von ~850 und ~1400 bp

Die aus dem Gel isolierten DNA-Fragmente der Größe von ~850 und ~1400 bp wurden in einer Nested-PCR mit den Primern RK-MTX-794F und RK-MTX-1222R bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C in 40 Zyklen amplifiziert und im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt:

DNA-Fragment ~850 [A], DNA-Fragment ~1400 bp [B], RK-MTX-1 Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 429 bp [C] RL-MTX-2 Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 623 bp [D]

Fragment 4

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA von 4 Klonen des 4. Fragments (ca. 350 bp) ergab, dass es sich um 2 unterschiedliche Fragmente handelte. Drei von vier Klonen mit einer Fragmentgröße von 358 bp wiesen im Vergleich zur cDNA des MTX-1 eine Deletion von 119 bp auf. Diese betrifft die Nukleotide 913-1031 und führt zu einer Verschiebung des Leserahmens. Diese Fragmente wurden einer Splicing-Variante MTX-5 zugeordnet (NCBI AY756272).

Ein Klon mit einer Fragmentgröße von 361 bp wies eine Deletion von 116 bp im Vergleich zur cDNA des MTX-1 auf. Diese führt ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserahmens, betrifft jedoch die Nukleotide 1032-1147. Dieses Fragment wurde einer Splicing-Variante MTX-6 zugeordnet (NCBI AY756271).

Im Vergleich mit der cDNA der Variante MTX-2 ist festzustellen, dass die Deletion des MTX-5 mit Beginn der Insertion des MTX-2 an nt 1032 endet, während die Deletion des MTX-6 an diesem Nukleotid beginnt.

Mittels RT-PCR wurden mit dem für die Niere verwandten Primerpaar auch aus Leber, Lunge und Milz DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, die dem Molekulargewicht der Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5/6 entsprachen (nicht gezeigt). Diese wurden in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert.

Der Vergleich der Sequenzen der cDNA-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 des renalen MTX-Carriers ist in Abb. 8 dargestellt.

5A

901	C T G G T G C C T C T G G T G G G T C T T C A A C T C G G C	RK-MTX-1
901	C T G G T G C C T C T G G T G G G T C T T C A A C T C G G C	RK-MTX-2
901	C T G G T G C C T C T G - - - - - - - - - - - - - - - - -	RK-MTX-5
901	C T G G T G C C T C T G G T G G G T C T T C A A C T C G G C	RK-MTX-6

931	A G G C T A C T A C C T G A T C A C C T A C T A T G T C C A	RK-MTX-1
931	A G G C T A C T A C C T G A T C A C C T A C T A T G T C C A	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
931	A G G C T A C T A C C T G A T C A C C T A C T A T G T C C A	RK-MTX-6

961	T G T C C T G T G G A A A A T C A C T G A C A G C A G G C T	RK-MTX-1
961	T G T C C T G T G G A A A A T C A C T G A C A G C A G G C T	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
961	T G T C C T G T G G A A A A T C A C T G A C A G C A G G C T	RK-MTX-6

991	C A A C T A C A A C G G T G C C G T A G A T G C C G C C T C	RK-MTX-1
991	C A A C T A C A A C G G T G C C G T A G A T G C C G C C T C	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
991	C A A C T A C A A C G G T G C C G T A G A T G C C G C C T C	RK-MTX-6

2A

1021	C A C A C T T C T G A - - - - - - - - - - - - - - - - -	RK-MTX-1
1021	C A C A C T T C T G A G T A T G C A C T G G A G G G C C C T	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1021	C A C A C T T C T G A - - - - - - - - - - - - - - - - -	RK-MTX-6

1032	- -	RK-MTX-1
1051	T G T G G G T C C C A G C T G G A C C C C A G C G G G C C G	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1032	- -	RK-MTX-6

1032	- -	RK-MTX-1
1081	G T A G T C C A C T A G C C C T A C C C C T T G C C C T G G	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1032	- -	RK-MTX-6

1032	- -	RK-MTX-1
1111	G C T A G A C C A C C A A T G T A G G C T G C C C C A T C C	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1032	- -	RK-MTX-6

1032	- -	RK-MTX-1
1141	C T C G C C C T A C C C T G C C A C C C T A A G T C A A C C	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1032	- -	RK-MTX-6

1032	- -	RK-MTX-1
1171	T G A C T C C C T A C C C A T G G T T C T G C T T A C C C A	RK-MTX-2
913	- -	RK-MTX-5
1032	- -	RK-MTX-6

Aus den Ergebnissen der RT-PCR ergaben sich 4 mögliche Splicing-Varianten des MTX-Carriers (RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6). Im Vergleich mit der Sequenz des RK-MTX-1 (gezeigt ab nt 901) weist die Variante MTX-2 eine Insertion von 203 bp nach nt 1031, die Variante MTX-5 ist eine Deletion von 119 bp (nt 913-1031) und die Variante MTX-6 eine Deletion von 116 bp (nt 1032-1147) auf. Anfang und Ende der Insertion der Variante MTX-2 sind mit 2A/2E, Anfang und Ende der Deletionen der Variante MTX-5 mit 5A/5E und der Variante MTX-6 mit 6A/6E gekennzeichnet.

4.1.2 Erstellung des full-length Klon RK-MTX-2

Zur Amplifizierung der 3'- und 5'- Enden der cDNA des RK-MTX-2 wurde die Methode der RACE-PCR angewandt und durch Klonierung dieser sich im Bereich der genspezifischen Primer überlappenden Fragmente der full-length Klon des RK-MTX-2 erstellt.

5'-RACE –PCR des RK-MTX-2

Als genspezifischer Primer diente der Primer RK-MTX-1229R, der in der Insertion des MTX-2 bindet. In Kombination mit dem MTX spezifischen Primer RK-MTX-746F ließ sich in der Touch-down-PCR aus der adaptorligierten cDNA ein spezifisches internes Fragment amplifizieren. Die Amplifikation des 5'-RACE-Fragments mit Hilfe der Kombination aus RK-MTX-1229R und dem Adaptorprimer 1 (AP1) gelang jedoch nicht. Im Rahmen von Optimierungsversuchen wurden die PCR-Bedingungen durch Erhöhung der Zyklenzahl der ersten Zyklen um 5 und 10, sowie durch Absenkung der Annealing-Temperatur um bis zu 3°C in den jeweiligen Zyklen variiert. Auch mit einem um 5 bzw. 9 nt verlängerten genspezifischen Primer und einem um 4 nt verkürzten AP 1, konnte kein spezifisches RACE-PCR Produkt amplifiziert werden.

Um dennoch den gesamten codierenden Bereich des MTX-2 zu erhalten und um Kenntnis über den 5'-untranslatierten Bereich des MTX-2 in der Niere zu gewinnen, wurde der AP-Primer gegen den RK-MTX spezifischen Primer RK-MTX-44F ausgetauscht. Dieser bindet vor dem vorausgesagten Translation-Initiationssignal ATG (nt 95-97) des RK-MTX-1 (HONSCHA et al. 2000). Mit dem Primerpaar RK-MTX-44F/RK-MTX-2-1229R ließ sich mittels Touch-down-PCR nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ein Fragment von ca. 1200 bp isolieren (Abb.9), welches über TA-Cloning in den pCR4 eingefügt wurde. Nach Überprüfung der erfolgten Insertion des 5'-Fragments in den Vektor mittels EcoRI-Restriktionsanalyse wurde das klonierte DNA-Fragment vollständig sequenziert.

Das Insert (1186 bp) ist im Vektor entgegen der Leserichtung (invers) orientiert und weist an nt 988 (nt 945 des Inserts) eine Sequenzabweichung zur cDNA des MTX-1 und RL-MTX-2 auf. Dabei handelt es sich um eine stille G-A Mutation an 3. Stelle des Triplets (sog. Wobble-Base). Die Sequenz in dem für die Regulation verantwortlichen 5'-untranslatierten Bereich des RK-MTX-2 ist identisch mit der des MTX-1 aus der Niere.

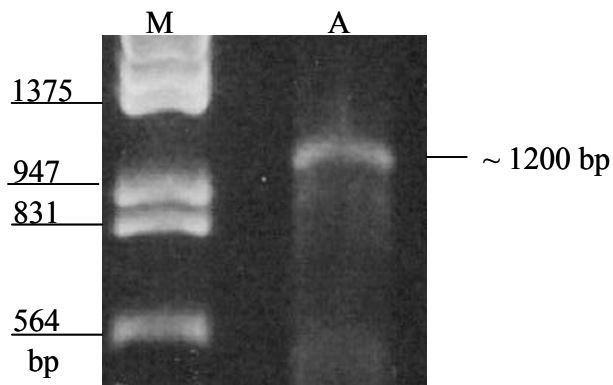


Abb. 9: Amplifikation des 5'- Fragments des RK-MTX-2

Mit dem Primerpaar RK-MTX-44F/RK-MTX-2-1229R ließ sich aus der Nieren-cDNA mittels Touch-down-PCR in 5, 10 und 45 Zyklen mit 61,5°C, 59,5°C und 58°C nach der elektrophoretischen Auftrennung im 1%igen Agarosegel ein Fragment der Größe von ca. 1200 bp isolieren [A]. Als Längenstandard diente der Marker DNA Sizer III [M].

3'- RACE-PCR des RK-MTX-2

Mit dem MTX-2 spezifischen Primer RK-MTX-2-1100F, der in der Insertion des MTX-2 bindet, und dem GeneRacer™ 3'-Primer konnte mit der adaptorligierten cDNA mittels Touch-down-PCR ein Fragment der zu erwarteten Größe von ca. 1400 bp amplifiziert werden (Abb.10). Dieses Produkt wurde aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und über TA-Cloning in den Vektor pCR4 kloniert. Nach positiver Restriktionsanalyse mit EcoRI wurde das klonierte 3'-RACE-Fragment vollständig (1416 bp) sequenziert. Im Vergleich zu den cDNAs des MTX-1 aus Leber und Niere und des RL-MTX-2, weist das klonierte DNA-Fragment an nt 1038 eine G-A Mutation auf. Bezogen auf die cDNA des RK-MTX-2 befindet sich diese Mutation an nt 2137 und damit außerhalb der codierenden Sequenz (Stopp-Codon nt 1082-1084, s. 3.1.5). Mit Ausnahme dieser stillen Mutation, weist das klonierte DNA-Fragment keine Sequenzabweichung zur cDNA des RL-MTX-2 auf.

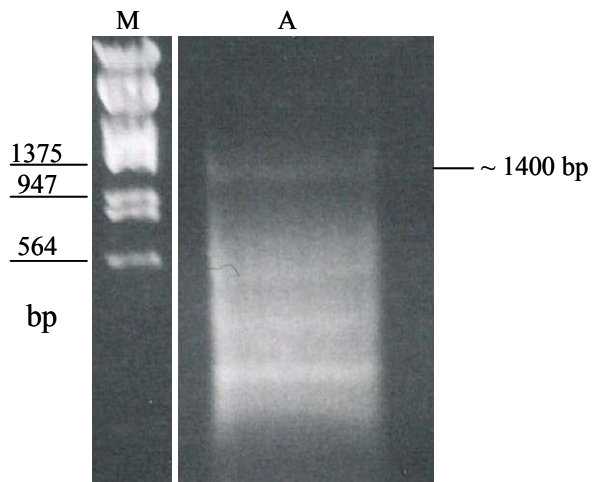


Abb. 10: Amplifikation des 3'-RACE Fragments des RK-MTX-2

Mit dem GeneRacer™ 3'-Primer und dem genspezifischen Primer RK-MTX-2-1100F wurde aus der adaptorligierten Nieren-cDNA mittels Touch-down-PCR in 5, 10 und 45 Zyklen mit 61,5°C, 59,5°C und 58°C ein DNA-Fragment der Größe von ca. 1400 bp amplifiziert und im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt [A]. Als Längenstandard diente der Marker DNA Sizer III [M].

Full-length Klon RK-MTX-2

Die in den pCR4 klonierten PCR-Produkte der 3'-RACE und des 5'-Fragments des RK-MTX-2 überlappen von nt 1100-1229. In diesem Bereich befindet sich eine Rekognitionssequenz für das Restriktionsenzym Hinc II an nt 1166. Eine weitere Erkennungssequenz für Hinc II im 3'-RACE Fragment ist an nt 6 des Adaptors lokalisiert. Demzufolge konnte das 3'-RACE-Fragment mittels Hinc II aus dem Vektor pCR4 isoliert und in den mit Hinc II linearisierten und dephosphorylierten Vektor pCR4+5'-Fragment unter Verwendung der T4-DNA-Ligase eingefügt werden (Klonierungsschema in Abb. 11). Die Restriktionsanalyse der erhaltenen Klone erfolgte mit den Restriktionsenzymen SacII und XmaI, die aufgrund der Lage ihrer Schnittstellen Aufschluss über die Orientierung des einklonierten 3'-RACE-Fragments zuließen: das in Leserichtung des 5'-Fragments eingefügte 3'-RACE-Fragment führt zu Schnittstellen bei nt 1256 (SacII) und nt 778 (XmaI) und damit zu einem Restriktionsfragment von 478 bp. Eine entgegen gerichtete Orientierung des 3'-RACE-Fragment resultiert in einem Restriktionsfragment von 1642 bp. Die Plasmid-DNA eines Klonen richtiger Orientierung wurde sequenziert und die korrekten Übergänge des 3'-RACE-Fragments in das 5'-Fragment bestätigt.

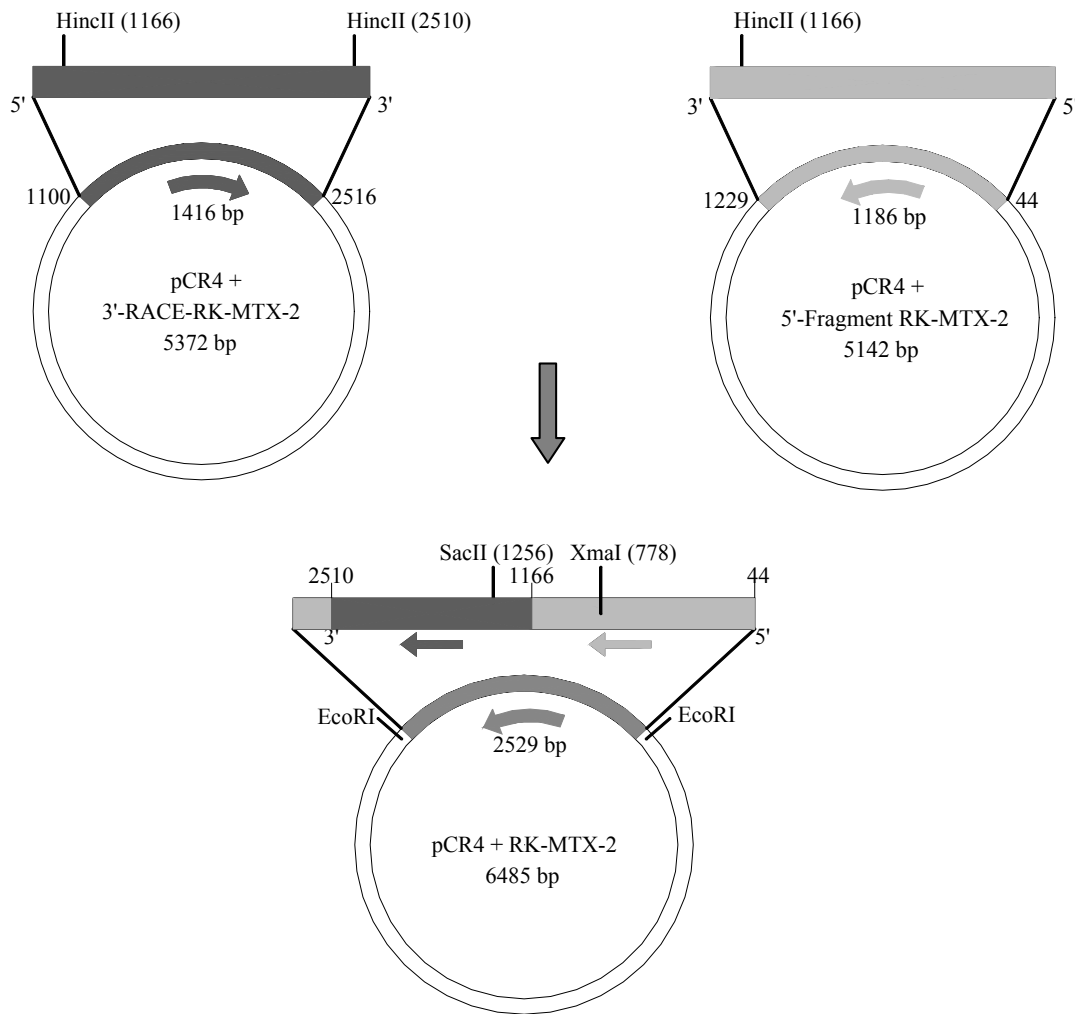


Abb. 11: Klonierungsstrategie zur Erstellung des full-length Klon RK-MTX-2

Das 3'-RACE-Fragment des RK-MTX-2 wurde über HincII aus dem Vektor isoliert und mittels T4-Ligase in den mit HincII linearisierten Vektor pCR4+5'-Fragment in das 5'-Fragment eingefügt. Die Orientierung des 3'-Fragments in das 5'-Fragment wurde über Restriktion mit SacII und XmaI überprüft.

4.1.3 Erstellung der full-length Klone des RK-MTX-5 und RK-MTX-6

Während durch die Insertion von 203 bp im MTX-2 die Möglichkeit zur Konstruktion von spezifischen Primern für den MTX-2 bestand, konnten aufgrund der Abwesenheit einer für den MTX-5 und MTX-6 spezifischen Sequenz (lediglich Deletion von 119 bp bzw. 116 bp im Vergleich zum MTX-1) keine Primer konstruiert werden, die ausschließlich Sequenzen der cDNAs des MTX-5 oder MTX-6 enthalten.

Stattdessen wurden in der PCR neben dem RK-MTX-746F die Primer MTX-5-1042R (22 nt) bzw. MTX-6-1158R (21 nt) verwendet. Diese wurden so konstruiert, dass sie jeweils Sequenzabschnitte von 10-12 nt mit einer Komplementarität zu den cDNA-Sequenzen aufweisen, die die jeweiligen Deletionen in 5'- und 3'- Richtung flankieren. Demzufolge können die Primer in ganzer Länge durchgehend an der cDNA des MTX-5 bzw. MTX-6 binden mit daraus resultierenden PCR-Produktgrößen von ca. 200 bp. An die cDNA des MTX-1 sollte aufgrund der kurzen komplementären Primersequenzen eine Anlagerung ausgeschlossen werden, so dass kein PCR-Produkt erwartet wurde (Abb.12a). Um die Spezifität dieser Primer zu testen, wurde die PCR mit Plasmid-DNA von MTX-5, MTX-6 und MTX-1 durchgeführt. Beim Einsatz von MTX-1 führte die PCR entgegen den Erwartungen auch nach schrittweiser Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 64°C bei 30 Zyklen zur Amplifikation eines DNA-Fragments von ca. 200 bp. Dies entsprach dem Molekulargewicht der PCR-Produkte von MTX-5 und MTX-6 (Abb.12b). Demnach eigneten sich die Primer MTX-5-1042R bzw. MTX-6-1158R nicht zur spezifischen Amplifikation der cDNA-Varianten MTX-5 bzw. MTX-6. Eine Erstellung der full-length Klone des RK-MTX-5 und RK-MTX-6 mittels RACE-PCR konnte infolgedessen nicht durchgeführt werden.

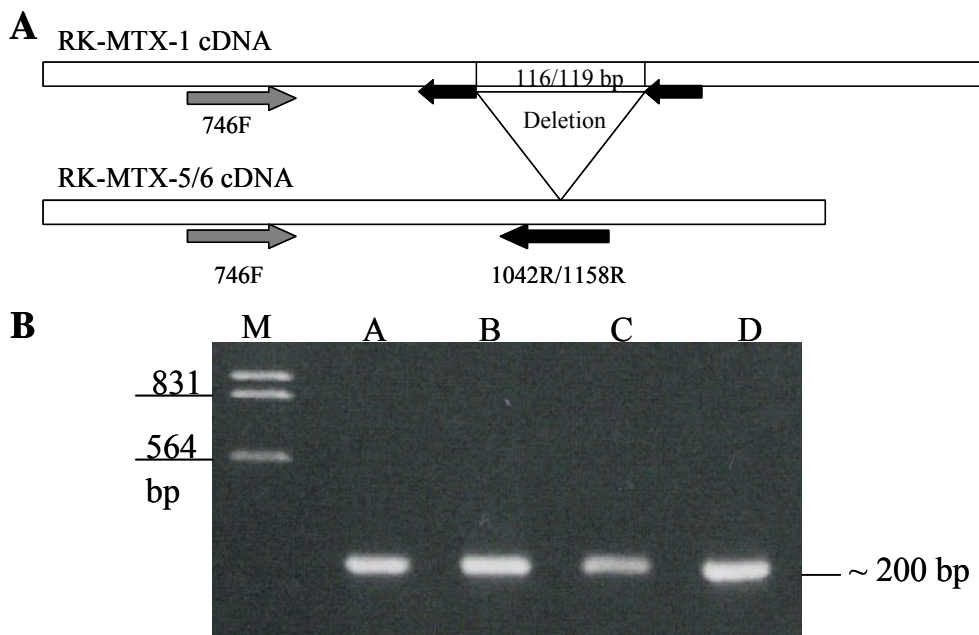


Abb. 12: Überprüfung der Spezifität der Primer MTX-5-1042R und MTX-6-1158R

a) Schematische Darstellung der Konstruktion der Primer MTX-5-1042R und MTX-6-1158R

b) PCR mit den Primern RK-MTX-746F und MTX-5-1042R bzw. MTX-6-1158R mit einer Annealing-Temperatur von 64°C bei 30 Zyklen. Die PCR-Produkte der cDNA-Varianten MTX-1, MTX-5 und MTX-6 wurden im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt: Längenstandard DNA Sizer III [M], Plasmid-DNA MTX-5; Primerpaar 746F/1042R [A], Plasmid-DNA MTX-1; Primerpaar 746F/1042R [B], Plasmid-DNA MTX-6; Primerpaar 746F/1158R [C], Plasmid-DNA MTX-1; Primerpaar 746/1158R [D]

4.1.4 Genomische Organisation des MTX-Gens (slc19a1)

Basierend auf den Daten des Rat Genome Project konnten durch Homologiesuche alle bisher aus Leber- und Nierengewebe der Ratte isolierten full-length MTX-cDNA Klone und Fragmente einem Locus auf dem Rattenchromosom 20 zugeordnet werden (NCBI AABR01066371). Insgesamt wurden auf diese Weise 7 Exons und 6 Introns identifiziert (Tab.1). Die Exon-Intron-Grenzen befinden sich in Übereinstimmung mit der GT-AG-Regel für die Splice-Donor und –Acceptor Sites mit Ausnahme des dritten Intron (Intron II), welches ein C statt eines T an Position +2 trägt. Alle detektierten MTX-mRNA-Varianten erschließen sich durch den Prozess des alternativen Spleißens (Abb. 13):

Die ersten beiden Exons werden alternativ in Leber und Niere genutzt und entsprechend als Exon I (Niere) und Exon 1a (Leber) bezeichnet.

Die Insertion von 203 bp des MTX-2 in Leber und Niere erklärt sich durch Retention des Intron III. Die Varianten MTX-5 und MTX-6 entstehen durch die verkürzten alternativen Exons IIIa und IVa.

Exon	Start	5'-Sequenz intron-EXON	Ende	3'-Sequenz EXON-intron	Größe (nt)	Besonderheit
I	5441 - GATCCG	5487	GGACGG - gtaggg	47	
Ia	5984 - GCGACC	6193	TGCGAA - gtgagt	210	
II	10898	ctccag - GTGGAG	11127	GAGCAG - gcacgt	230	ATG
III	15470	gcgcag - GTGACC	16223	TTCTGA - gtatgc	754	
IIIa	15470	gcgcag - GTGACC	16104	CCTCTG - gtgggt	635	+2
IV	16472	ctccag - GCGCCA	16619	TGCCAC - gtgagt	193	
Iva	16543	ttccag - ATCCCG	16619	TGCCAC - gtgagt	77	+2
V	17842	tcccag - TTTTCA	17983	CAACAG - gtaaa	142	
VI	22113	tctcag - TTCCGC	23003	ACTACA -	891	Stop
intron III	16224	gtatgc -	16426	- ctccag	203	Stop

Tab. 1: Genomische Organisation des MTX-Gens

Ein Vergleich der bekannten und neu detektierten Sequenzen der MTX-Varianten (RL-MTX-1, RL-MTX-2; HONSCHA et al. 2000, RK-MTX-1; KNEUER et al. 2004, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6) mit den Daten des Rat Genome Project führte zur Identifizierung des MTX-Gens (slc19a1) und zur Aufklärung seiner genomischen Organisation. Es umfasst 7 Exons und 6 Introns. Laut Vorhersage ist das Start-Codon in Exon II, das Stopp-Codon in Exon VI lokalisiert. Die Besonderheit +2 kennzeichnet eine Verschiebung des Leserahmens.

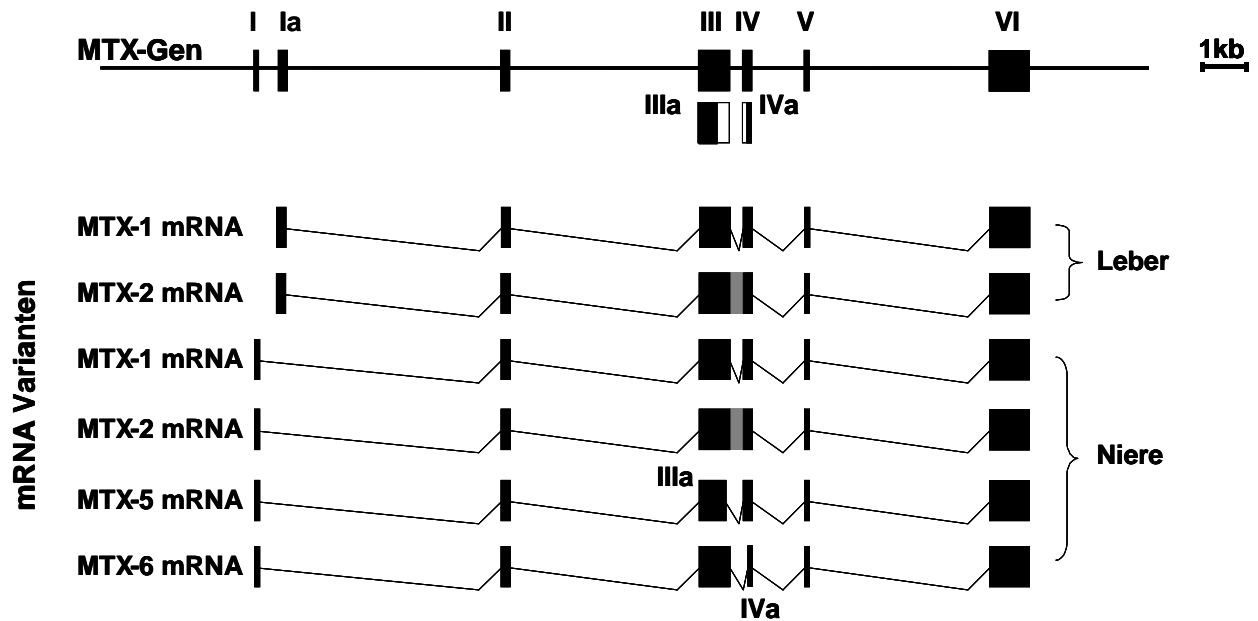


Abb. 13: Genomische Organisation des MTX-Gens und seine alternativen mRNA-Transkripte in Leber und Niere

Für das MTX-Gen wurden 7 Exons und 6 Introns identifiziert. Die Exons I und Ia werden alternativ in Leber und Niere genutzt. Das Intron III wird in den MTX-2 Varianten transkribiert. In der Variante MTX-5 ist das Exon III (Exon IIIa), in der Variante MTX-6 das Exon IV verkürzt (IVa).

Die Exons sind als schwarze Kästen, nicht transkribierte Introns als durchgehende Linie, andernfalls als grauer Kasten, gezeigt.

4.1.5 Vorhersage der Proteinstrukturen

Um die Auswirkungen des alternativen Spleißens auf die mögliche Proteinstruktur zu analysieren, wurde der längste offene Leserahmen (ORF) in sein Translationsprodukt umgeschrieben (Abb. 14).

Das Start-Codon ATG ist laut Vorhersage in allen Varianten an nt 48-50 des Exon 2 lokalisiert. Das dazugehörige Stopp-Codon beginnt an nt 265 des Exon VI. Die Sequenz des MTX-1 der Leber und Niere wäre demzufolge in der codierenden Region identisch. Der ORF codiert für ein Polypeptid aus 512 AS und einem Gewicht von 58 kDa. Ein N-terminales Sekretionssignal, sowie intrazelluläre Retentionssignalsequenzen wurden nicht ermittelt.

Die Retention des Intron III des MTX-2 der Leber und Niere führt nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens, aber bedingt durch ein vorzeitiges Stopp-Codon an nt 51 im Intron III endet der offene Leserahmen in diesem. Bis zur AS 313 ist das resultierende Polypeptid daher mit der Variante des MTX-1 identisch. Das Intron III enthält vor dem Stopp-

Codon jedoch 16 zusätzliche Codons für differierende AS. Daraus ergibt sich ein Peptid mit 329 AS und einem Gewicht von 38 kDa.

In den Varianten MTX-5 und MTX-6 sind die Exons III und IV verkürzt. Die Deletionen von 119 bzw. 116 bp sind nicht in frame und führen jeweils zu einer Verschiebung des Leserahmens. Infolgedessen wird in beiden Varianten ein vorzeitiges Stopp-Codon in Exon V an nt 25 generiert.

Das Protein MTX-5 mit 345 AS und einem Molekulargewicht von 39 kDa ist mit dem MTX-1 bis zur AS 273 identisch. Das Protein MTX-6 mit 346 AS und einem Molekulargewicht von 40 kDa ist bis zur AS 312 mit der Sequenz des MTX-1 identisch.

Nach Voraussage der Membrantopologie besteht das Protein MTX-1 aus 12 TMD (HONSCHA et al. 2000). Die vorzeitigen Stopp-Codons der Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 führen zu verkürzten Proteinen. Für die Varianten MTX-2 und MTX-6 sind 7 TMD, für den MTX-5 nur 6 TMD vorausgesagt. Im Gegensatz zum MTX-1 und MTX-5, bei denen beide Termini intrazellulär lokalisiert sind, ist der C-Terminus der Varianten MTX-2 und MTX-6 extrazellulär vorhergesagt. Die identische C-terminale Sequenz von MTX-5 und MTX-6 weist vermutlich eine β -Faltblatt Struktur auf. Allen Varianten gemeinsam ist die große intrazelluläre Schlaufe zwischen TMD 6 und TMD 7 mit 2 vermutlich α -helikal angeordneten Abschnitten, die durch eine prolinreiche Region getrennt sind.

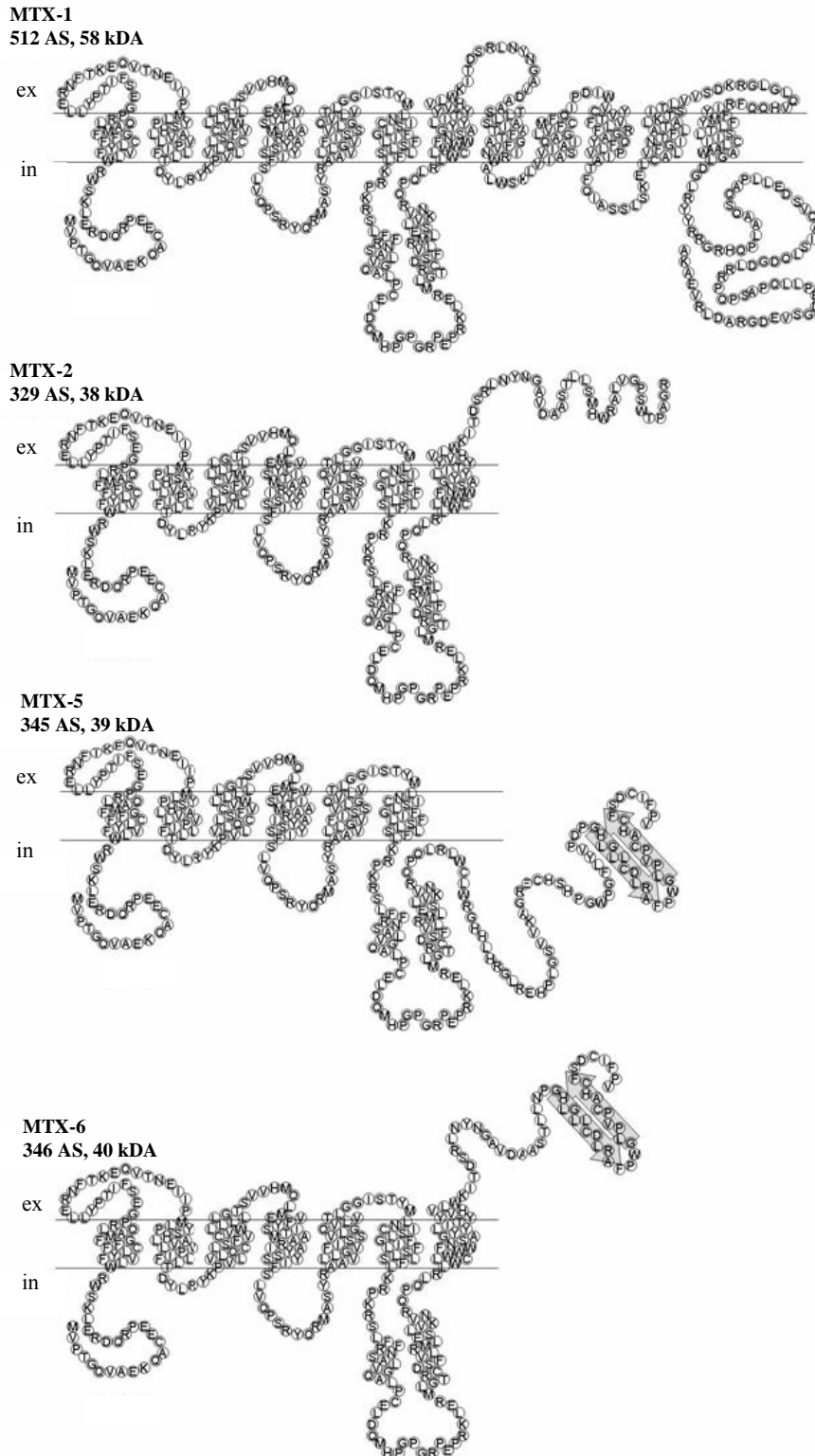


Abb. 14: Prediktion der Translationsprodukte der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6

Der längste offene Leserahmen jeder Variante wurde in das mögliche Translationsprodukt umgeschrieben. Für die Varianten RL/RK-MTX-1 und RL/RK-MTX-2 sind jeweils identische Proteine mit 12 TMD und einem Molekulargewicht von 58 kDa (MTX-1) bzw. mit 7 TMD und 38 kDa (MTX-2) vorausgesagt. Aus den mRNA-Varianten MTX-5 und MTX-6 ergeben sich mögliche Translationsprodukte von 40 kDa mit 6 TMD bzw. 39 kDa mit 7 TMD.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des RK-MTX-2

Um zu überprüfen, ob RK-MTX-2 eine zelluläre Methotrexat-Aufnahme vermittelt, wurden MDCK-Zellen mit einem die full-length cDNA enthaltenden Expressionsplasmid stabil transfiziert. Da für den Nachweis der Proteinexpression des RK-MTX-2 und die Ermittlung der subzellulären Lokalisation des Proteins keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung standen, wurde weiterhin die cDNA des RK-MTX-2 am 3'-Ende mit einer das Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) kodierenden Sequenz versehen. Durch die geringe Größe des resultierenden Nonapeptids (YPYDVPDYA) sollte verhindert werden, dass die Funktion des modifizierten Proteins beeinflusst wird. Der HA-Tag ermöglicht durch Expression als Teil eines Fusionsproteins eine gezielte Detektion durch spezifische kommerziell erhältliche Antikörper im Rahmen der Immunfluoreszenz und des Westernblots. Für diese Untersuchungen wurden MDCK-Zellen ebenfalls stabil transfiziert.

4.2.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

4.2.1.1 pIRES-RK-MTX-2

Für die stabile Transfektion wurde die full-length cDNA des RK-MTX-2 aus dem Vektor pCR4 in den Expressionsvektor pIRES subkloniert (Abb. 15). Hierzu wurde das Insert RK-MTX-2 unter Verwendung des Restriktionsenzym *EcoRI* mit den Schnittstellen an nt 283 und 2830 aus dem pCR4 isoliert. Der Vektor pIRES-S2 wurde mit *EcoRI* linearisiert (Schnittstelle an nt 629) und anschließend mit CIP dephosphoryliert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurden Insert und Vektor mittels der T4-DNA-Ligase ligiert. Ein geeigneter Klon wurde durch die Restriktionsanalyse mit *SmaI* ermittelt und die Plasmid DNA durch Midi-Präparation gewonnen.

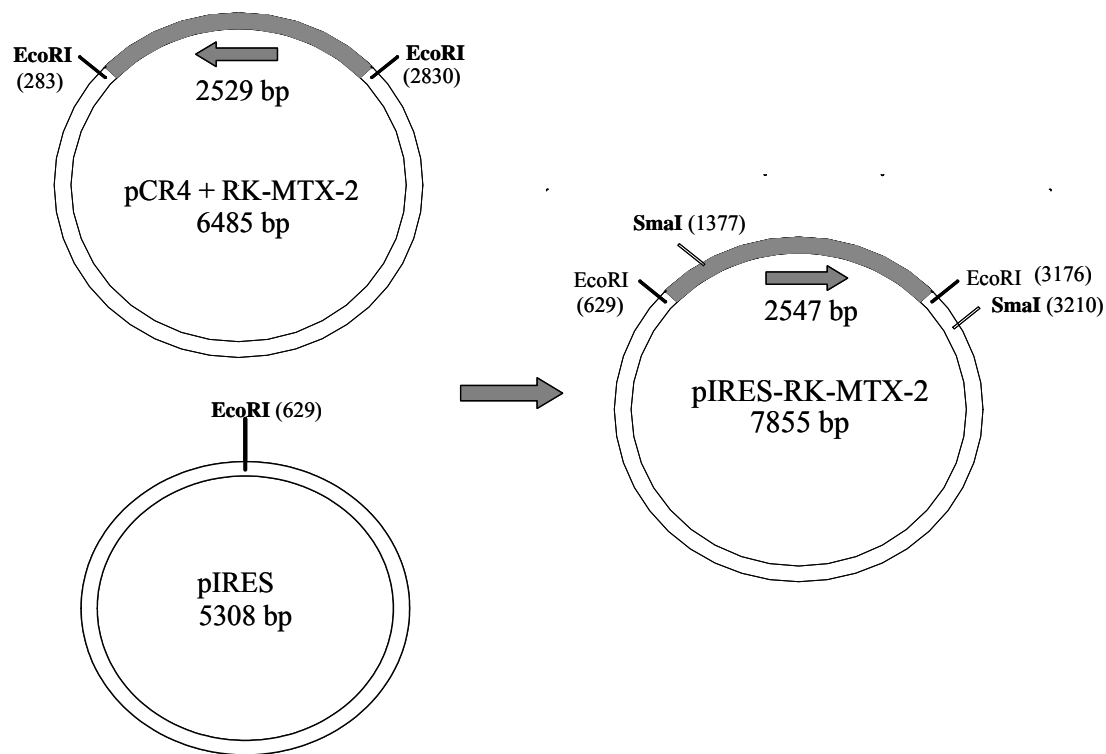


Abb. 15: Klonierungsschema zur Erstellung des Expressionsvektors pIRES-RK-MTX-2

Die full-length cDNA des RK-MTX-2 wurde über EcoRI aus dem Vektor pCR4 isoliert und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pIRES eingefügt. Die Insertion und richtige Orientierung des Inserts wurde über Restriktionsanalyse mit dem Enzym SmaI bestimmt. Aus dessen Schnittstellen an nt 1377 und 3210 resultierte ein Restriktionsfragment der Größe von 1833 bp.

4.2.1.2 pCR3.1-MTX-2-HA

Zum Ersetzen des Stopp-Codons und zur Einführung der HA-Tag codierenden Sequenz in die cDNA des RK-MTX-2 wurde eine Mutagenese-PCR auf dem pCR4-5'-Fragment (nt 44 – nt 1229) mit den Primern RK-MTX-2-44F und MTX-2-HA durchgeführt. Der Primer MTX-2-HA bestand aus 46 Nukleotiden. Diese sind komplementär zu nt 1066-1081 der cDNA des RK-MTX-2. Das erste Codon des Nonapeptid (TAC) mutiert das Stopp-Codon (TAG) an nt 1082-1084. Die folgende codierende Sequenz (24 nt) wurde um ein abschließendes Stopp-Codon ergänzt (Abb. 16A).

Das PCR-Produkt (1069 bp) wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und über TA-Cloning in den Vektor pST Blue1 ligiert. Nach der Transformation und Plasmidpräparation der nicht gefärbten Bakterien-Kolonien (Blue-White-Screening) erfolgte die Restriktionsanalyse mit EcoRI. Die Sequenzierung von 2 Plasmiden

zeigte, dass die beabsichtigte Modifikation erfolgt war. Beide Inserts waren vollständig vorhanden, invers orientiert und wiesen keine weiteren Mutationen auf.

Für die Umklonierung in den Expressionsvektor pCR3.1 wurde dieser mit EcoRI linearisiert und anschließend mit CIP dephosphoryliert. Das über EcoRI geschnittene Insert MTX-2-HA aus dem pST Blue1 wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von Insert und Vektor mit T4 Ligase in den Vektor ligiert (Abb.16B).

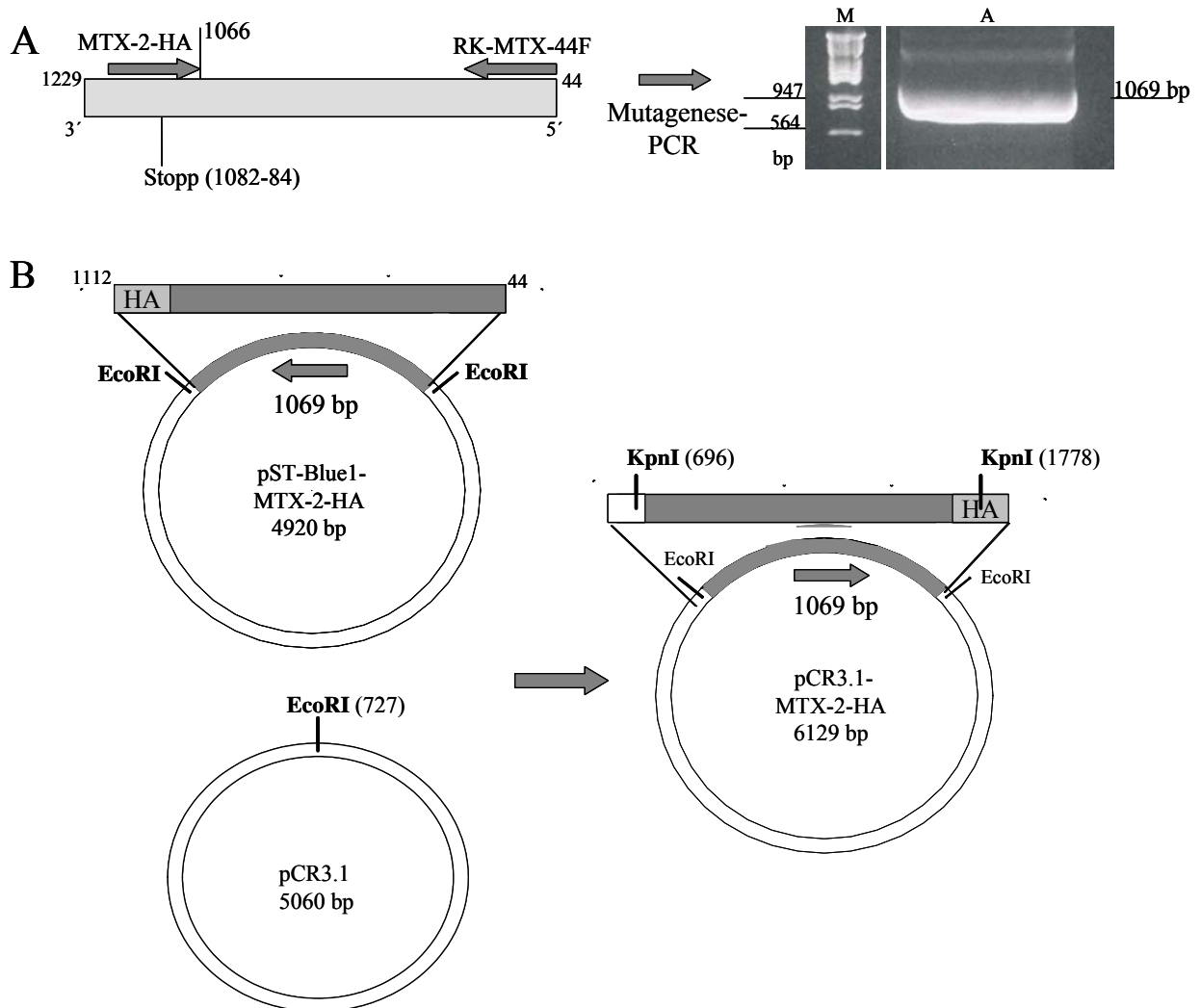


Abb. 16: Klonierungsschema zur Erstellung des pCR3.1-MTX-2-HA

A) Einführung der HA-Sequenz in die cDNA des RK-MTX-2: Unter Verwendung von 1 ng Plasmid-DNA wurde in einer Mutagenese-PCR mit den Primern RK-MTX-44F und MTX-2-HA bei 58°C in 15 Zyklen ein PCR-Produkt der theoretischen Größe von 1069 bp amplifiziert und im präparativen 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Längenstandard DNA Sizer III [M], RK-MTX-2-HA (25 µl des PCR-Produkts) [A].

B) Nach TA-Klonierung des PCR- Produkts RK-MTX-2-HA in den pST-Blue1 wurde das Insert über EcoRI isoliert und in den mit EcoRI linearisierten pCR3.1 mittels T4 Ligase eingefügt. Die Insertion und richtige Orientierung des Inserts wurde über Restriktionsanalyse mit dem Enzym KpnI bestimmt.

Die Restriktion mit KpnI der aus den Kolonien gewonnenen Plasmide ergab Aufschluss über die Orientierung des Inserts. Das Insert nimmt die Position 738-1805 im Plasmid ein. Bei richtiger Orientierung restringiert KpnI an nt 696 und 1778 (1082 bp), sonst an nt 696 und 765 (69 bp). Nach Auswertung der Gelelektrophorese wurde 1 Klon mit richtiger Orientierung für die Midi-Präparation verwendet.

4.2.2 Transportaktivität des RK-MTX-2 in stabil transfizierten MDCK-Zellen

4.2.2.1 Stabile Transfektion von MDCK-Zellen mit pIRES-RK-MTX-2

Die MDCK-Zellen wurden unter Verwendung des Transfektionsreagenz PEI mit dem Expressionsvektor pIRES-RK-MTX-2 aus der Midi-Präparation transfiziert, wobei die G418 Selektion nach 14 Tagen abgeschlossen war. Von 18 selektierten Einzelzellklonen wurde die RNA von 9 Zellklonen isoliert und mittels RT-PCR die mRNA- Expression des RK-MTX-2 geprüft.

Mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-2-1132R konnten unter PCR-Standardbedingungen 5 positive Zellklone (S-2, S-5, S-9, S-13, S17) ermittelt werden. Die PCR-Produkte dieser Klone waren mit der Größe des PCR-Produkts der eingesetzten Positivkontrolle RK-MTX-2 identisch (386 bp), während aus den anderen 4 Klonen kein PCR-Produkt amplifiziert wurde (Abb.17).

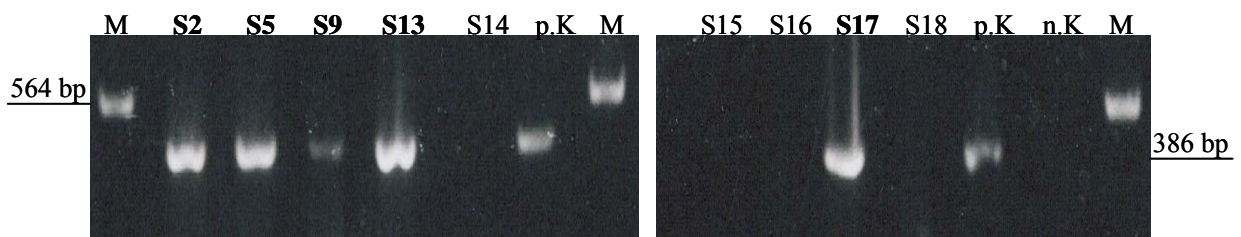


Abb. 17: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2 in den stabil transfizierten MDCK-Zellklonen

Unter Verwendung von je 1 µg Gesamt-RNA wurden 9 Zellklone (S2, S-5, S-9, S-13-18) mittels RT-PCR mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-1132R bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C in 30 Zyklen auf die RNA-Expression von RK-MTX-2 überprüft. Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Längenstandard DNA Sizer III [M], PCR-Produkte der Zellklone [S2, S-5, S-9, S-13-18], Positivkontrolle RK-MTX-2 Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 386 bp [p.K], Negativkontrolle H₂O [n.K].

4.2.2.2 Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat in RK-MTX-2 Transfektanten

Zur funktionellen Charakterisierung des RK-MTX-2 wurden die zuvor ermittelten MTX-2 positiven Zellklone MDCK-S-2, -S-5, -S-9, -S-13 und -S-17 auf eine vorhandene Transportaktivität von radioaktiv markierten MTX überprüft. Als Kontrollzellen dienten die nicht transportaktiven untransfizierten MDCK-Zellen und die mit dem MTX-1 transfizierte transportaktive Zelllinie MDCK-3B (KNEUER et al. 2004).

Zum Erreichen des erforderlichen Konfluenzgrades der Zellen von 80-90% am Tag der Messung der Transportaktivität, wurden für alle Zelllinien $1,1 \times 10^6$ Zellen pro Kulturschale zur Aussaat benötigt. Davon abweichend, wiesen die Zellen des Klon S-5 ein außerordentlich schnelles Wachstum auf, infolgedessen die Zellzahl zur Aussaat auf 7×10^5 reduziert werden musste.

Die Aufnahmemessung von $^3\text{[H]}$ -MTX (5 μM) erfolgte über 20 Minuten in natriumhaltigem Tyrode-Puffer. Die zellassoziierte Radioaktivität der jeweiligen Proben wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt (s. 3.2.3.6). Die Darstellung der aufgenommenen Substratmenge erfolgte in pmol pro mg Protein.

Der Ausgangswert der MTX-Aufnahme zum Zeitpunkt $t = 0,25$ min lag bei allen getesteten Zelllinien bei ca. 8-11 pmol/mg Protein. Für die MTX-2 positiven Zellklone S-2, S-9, S-10 und S-13 konnte wie für die untransfizierten MDCK-Kontrollzellen keine Transportaktivität nachgewiesen werden. Für die mit dem RK-MTX-1 transfizierte Zelllinie MDCK-3B und für den RK-MTX-2 Zellklon S-5 konnte nach einer initialen Aufnahme über 3 min und Einstellung eines intrazellulären Gleichgewichts nach 5 min schließlich ein annähernd 2-facher MTX-Gehalt (22/21 pmol/mg) im Vergleich zum Ausgangswert bei $t = 0,25$ min (11 pmol/mg) verzeichnet werden. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien waren die Standardabweichungen beim Zellklon S-5 stärker ausgeprägt (Abb. 18).

4.2.3 Expression und Lokalisation von MTX-2-HA in stabil transfizierten MDCK-Zellen

Die stabile Transfektion der MDCK-Zellen mit dem Expressionsvektor pCR3.1-RK-MTX-2-HA erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenz PEI und war nach 10 Tagen unter G418-Selektion abgeschlossen.

Die Gesamt-RNA von 2 Zellklonen MDCK-T1 und MDCK-T2 wurde mittels RT-PCR mit den Primern RK-44F und MTX-2-HA auf die Expression des RK-MTX-2-HA überprüft und nach positiven Ergebnis (Abb.19A) für die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der

Proteinexpression und Ermittlung der subzellulären Lokalisation des RK-MTX-2 verwandt. Hierbei konnte eine vom Hintergrund abweichende und damit spezifische Fluoreszenz in beiden Zelllinien nicht ermittelt werden.

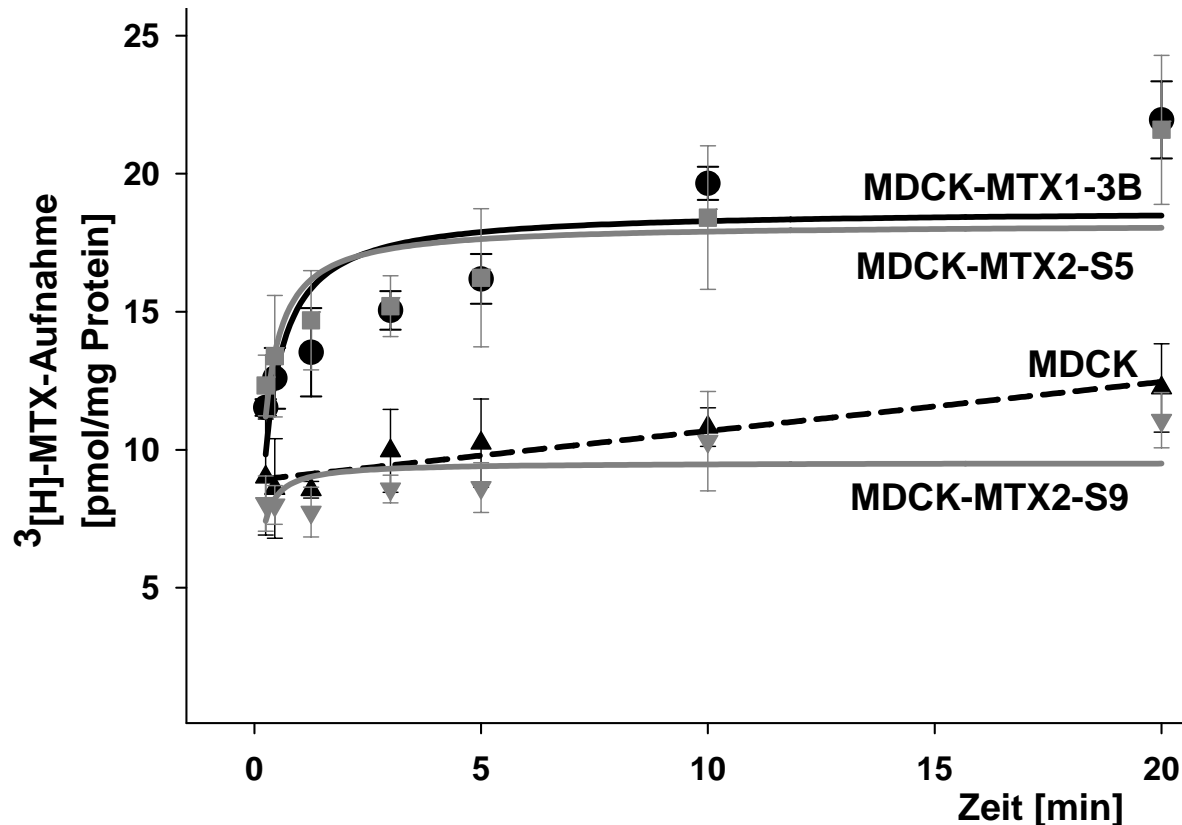


Abb. 18: ^3H -MTX-Aufnahme in transfizierten MDCK-MTX-2-, MDCK-MTX-1- und untransfizierten MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden zu $1,1 \times 10^6$ bzw. 7×10^5 (Zellklon S-5) Zellen pro Zellkulturschale über 72 h kultiviert. Die Messung der ^3H -MTX-Aufnahme erfolgte zu den Zeitpunkten $t = 0,25; 0,75; 1,25; 3; 5; 10$ und 20 min im natriumhaltigen Tyrode-Puffer. Der intrazelluläre ^3H -MTX-Gehalt wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt ($\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 4$).

Für den Nachweis des MTX-2-HA im Westernblot wurde der Zellklon MDCK-T2 subkloniert, wovon zwei der daraus resultierenden Zellklone (T2-4 und T2-6) mittels RT-PCR mit dem Primerpaar RK-MTX-44F/ MTX-2-HA auf die mRNA-Expression kontrolliert wurden (Abb. 19B). Während für den Klon T2-4 nach der Gelelektrophorese kein PCR-Produkt aufgetrennt wurde, entsprach das PCR-Produkt des Klon T2-6 mit einer Produktgröße von 1069 bp dem PCR-Produkt des transfizierten Plasmids pCR3.1-MTX-2-HA.

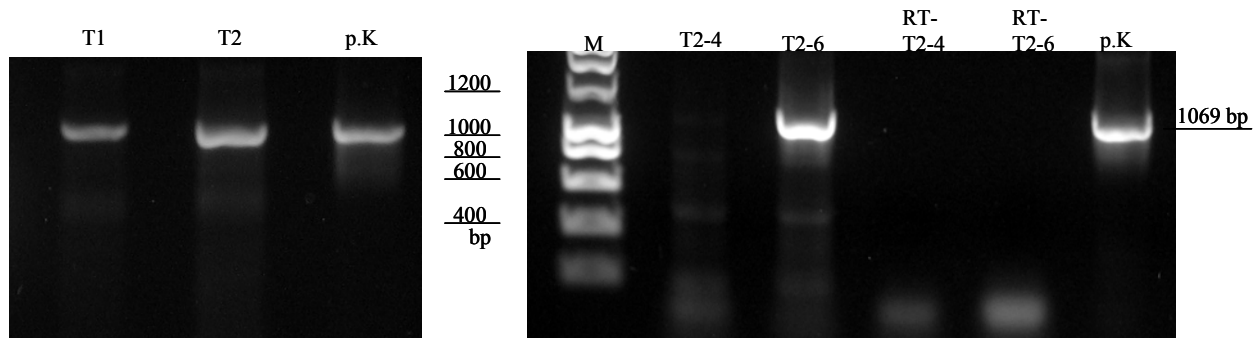


Abb. 19: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2-HA in stabil transfizierten MDCK-Zellklonen und in MDCK-T2 subklonierten Zellklonen

Unter Verwendung von je 1 µg Gesamt-RNA wurden 2 Zellklone mittels RT-PCR mit den Primern RK-MTX-44F und MTX-2-HA bei einer Annealing-Temperatur von 56°C in 30 Zyklen auf die RNA-Expression von MTX-2-HA überprüft. Die PCR-Produkte wurden im % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Längenstandard Hyperladder I [M], Positivkontrolle MTX-2-HA Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 1069 bp [p.K], PCR-Produkte der Zellklone [T1, T2], PCR-Produkte der Zellklone [T2-6, T2-4], Negativkontrollen 50 ng RNA[RT-T2-6, RT-T2-4].

Dieser Zellklon T2-6 wurde im Western-Blot hinsichtlich des Vorhandenseins des MTX-2-HA Fusionsproteins überprüft. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie MDCK 2-19, welche mit einer HA-Tag modifizierten MTX-1 cDNA stabil transfiziert worden war (KNEUER et al. 2004b). Für die MDCK 2-19 waren 2 deutliche Banden mit einem Molekulargewicht (MG) von ca. 52 und 70 kDa abzugrenzen. Diese entsprechen in ihrem Molekulargewicht der glykosylierten (73 kDa) und unglykosylierten Form (58 kDa) des MTX-1.

Hingegen konnte für die Zelllinie T2-6 kein dem MTX-2 spezifisches Produkt nachgewiesen werden, welches nach der Vorhersage ein MG von 38 kDa (unglykosyliert) bzw. 53 kDa (glykosyliert) aufweisen sollte (Abb. 20).

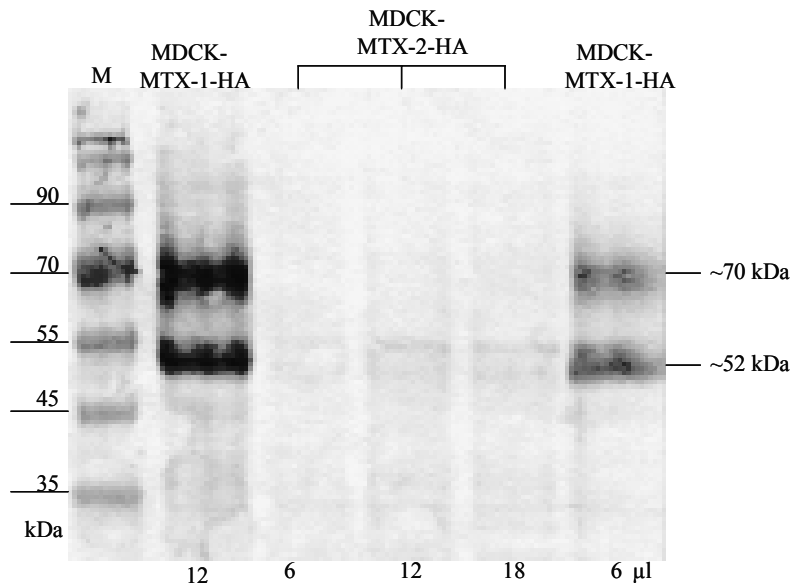


Abb. 20: Westernblot-Analyse der stabil transfizierten Zelllinien MDCK2-19 (MTX-1-HA) und MDCK-T2-6 (MTX-2-HA)

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Lysate der beiden Zelllinien (Auftrag 6-18 µl) wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem Primär-AK Polyclonal Rabbit Anti-HA und dem Sekundär-AK Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / AP auf die Expression von MTX-1-HA bzw. MTX-2 HA überprüft. Als Längenstandard diente der Protein-Marker IV [M].

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass von 5 Zellklonen, welche die RK-MTX-2 mRNA nachgewiesenermaßen exprimierten, einem Klon (S-5) eine Aufnahme von MTX zugeordnet werden konnte. Dieser Klon wies jedoch mit seinem schnellen Wachstum im Vergleich zu den anderen MDCK-Zelllinien eine phänotypisch veränderte Eigenschaft auf, die durch die reduzierte Zellaussaat zu abweichenden Versuchsbedingungen führte. Aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern gegen MTX-2 konnte die Expression des Proteins in dieser Zelllinie nicht untersucht werden.

Weiterhin wurden Zelllinien erzeugt, die stabil mit der kodierenden Sequenz für das grundsätzlich immunologisch zugängliche MTX-2-HA erzeugt und mittels RT-PCR der Nachweis der Genexpression erbracht. Das Proteins MTX-2-HA konnte jedoch weder mittels der indirekten Immunfluoreszenz noch Western-Blotting nachgewiesen werden.

4.3 Expression und Lokalisation der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 als GFP-Fusionsproteine

Nachdem sich die immunologischen Untersuchungen an den stabil transfizierten MDCK-Zellen mit der HA-Tag modifizierten cDNA des RK-MTX-2 als möglicherweise nicht ausreichend sensitiv darstellten, wurden für alle Splicing-Varianten Expressionsplasmide erzeugt, welche die entsprechenden GFP-MTX-Fusionsproteine kodieren. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein Protein bestehend aus 238 AS, welches bei Anregung mit blauen oder ultravioletten Licht direkt sichtbar grün fluoresziert, ohne dafür weitere Cofaktoren oder Substrate zu benötigen.

Das GFP wird als Fusionsprotein am N- oder C-Terminus zusammen mit dem zu untersuchenden Protein exprimiert, indem die cDNAs beider Proteine im gleichen Leserahmen codieren. Dadurch ist es möglich, das zu untersuchende Protein direkt in seiner räumlichen und zeitlichen Verteilung an transfizierten Zellen zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde der Vektor pEGFP-C2 verwendet, mit dem das GFP am N-Terminus der möglichen MTX-Proteinvarianten exprimiert wird. Zu Transfektionszwecken wurde die Plasmid-DNA mittels Midi-Präparation (s. 3.2.1.5.3) gewonnen.

4.3.1 Klonierung der GFP-MTX Konstrukte

4.3.1.1 GFP-MTX-2

Zur Konstruktion des GFP-MTX-2 Fusionsprotein wurde die cDNA des RK-MTX-2 aus dem Vektor pIRES (s. 3.2.1.1) verwandt und in den Vektor pEGFP-C2 subkloniert. Die Isolation des Inserts erfolgte mit den Restriktionsenzymen XhoI (nt 613) und BamHI (nt 3207), so dass es mittels T4-Ligase gerichtet in den Vektor pEGFP-C2 eingefügt wurde, der ebenfalls mit XhoI (nt 1347) und BamHI (nt 1394) restringiert wurde (Abb. 21). Einer der positiven Klone, der in der Restriktionsanalyse mit EcoRI ein Restriktionsfragment der Größe von 2547 bp aufwies, wurde mit dem Primer RK-118R sequenziert und der korrekte Übergang von der DNA des GFP in die cDNA des RK-MTX-2 dadurch bestätigt.

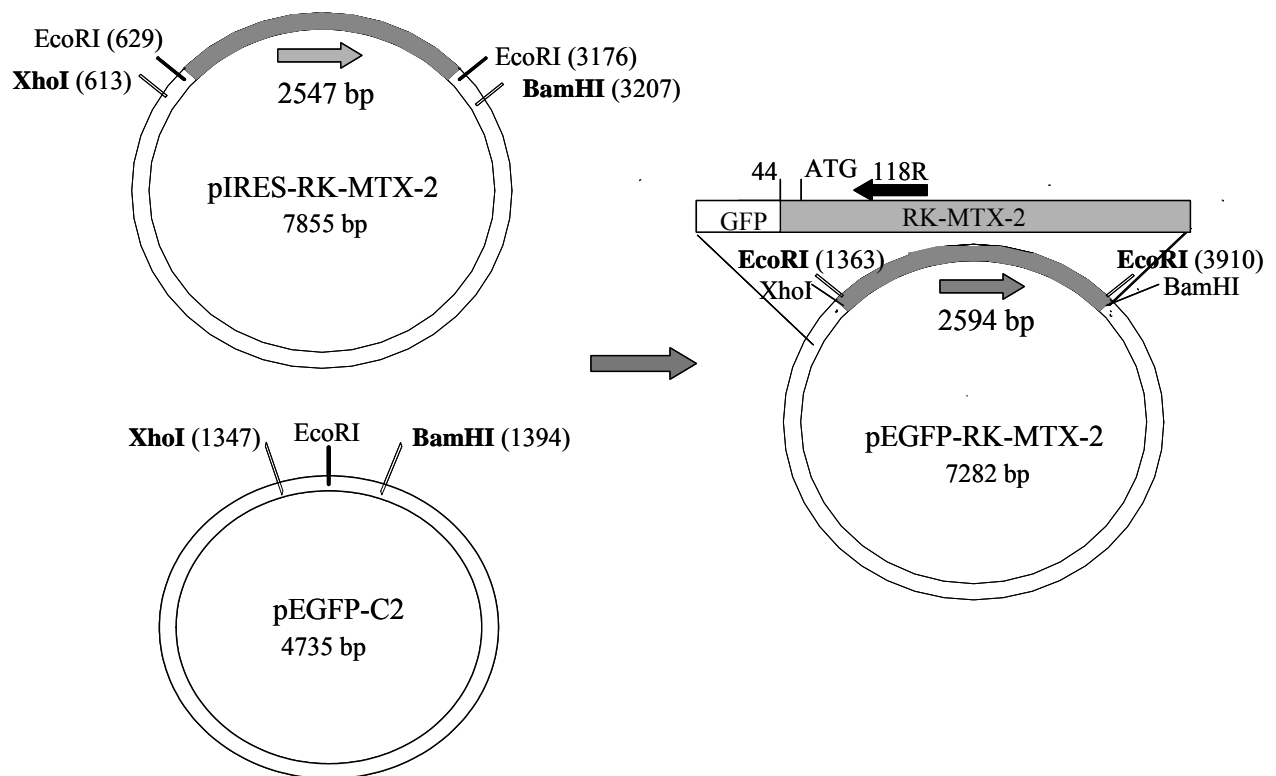


Abb. 21: Klonierungsschema zur Erstellung des pEGFP-RK-MTX-2

Die cDNA des RK-MTX-2 wurde über XhoI und BamHI aus dem Vektor pIRES isoliert und in den ebenfalls mit diesen Enzymen restringierten Vektor pEGFP eingefügt. Die Restriktionsanalyse erfolgte über EcoRI, die Sequenzierung mit dem Primer 118R.

4.3.1.2 GFP-MTX-1

Der im Institut vorliegende RK-MTX-1-HA im pCR3.1 (KNEUER et al. 2005) wurde zunächst als Ausgangsprodukt in eine PCR mit den Primern RK-MTX-44F und BGH (bindet hinter dem Insert am Vektor) eingesetzt. Die PCR diente dem Zweck, den 5'-untranslatierten Bereich des RK-MTX-1 erst ab nt 44 zu amplifizieren, um die gleichen Bedingungen wie für den RK-MTX-2 herzustellen, der ebenfalls ab nt 44 kloniert wurde (s. 3.1.4).

Das amplifizierte PCR-Produkt der Größe von ca. 1700 bp (Abb. 22A) wurde mittels TA-Cloning in den Vektor pST-Blue1 eingefügt.

Die erfolgte Insertion wurde über die Restriktionsanalyse mit EcoRI nachgewiesen und das Insert von 2 der positiven Klone mit den Primern T7, 489F, 1222R und Sp6 vollständig sequenziert. Hierbei musste festgestellt werden, dass beide (invers eingefügten) Inserts an nt 375 eine Punktmutation C statt T aufwiesen, die einen Austausch der AS P94 → C bedingt.

Aus diesem Grund wurde der MTX-1-44F in dieser Form nicht in den Vektor pEGFP eingefügt. Stattdessen wurde die für den MTX-2 spezifische Sequenz des GFP-MTX-2 ab nt 780 (vor Beginn der Insertion) mittels der Restriktionsenzyme SmaI und BamHI entfernt und entsprechend die Sequenz des MTX-1 ab nt 780 gerichtet angefügt (Abb. 22B).

Die Restriktion erfolgte zunächst mit BamHI, das im pST-Blue1 20 Nukleotide vor dem Insert MTX-1 und im GFP-MTX-2 nach dem Insert an nt 3946 restringiert. Anschließend wurden die linearisierten Plasmide nach der gelelektrophoretischen Auftrennung extrahiert und mit SmaI restringiert. SmaI restringiert an nt 780 der jeweiligen Inserts und zusätzlich im pST-Blue1 an nt 2271.

Demzufolge wurden in der Gelelektrophorese für den MTX-1-44F im pST-Blue1 3 Produkte mit einer Produktgröße von 2904 bp, 1664 bp und 944 bp aufgetrennt, wobei das Fragment der Größe von 944 bp dem MTX-1 ab nt 780 entsprach. Aus dem GFP-MTX-2 resultierten 2 Restriktionsfragmente der Größe von 5425 bp und 1857 bp, welches dem zu entfernenden Fragment des MTX-2 entsprach. Die DNA-Fragmente der Größe von 944 und 5425 bp wurden mittels T4-Ligase ligiert. Die Restriktionanalyse erfolgte mit EcoRI.

4.3.1.3 GFP-MTX-5 und GFP-MTX-6

Die Varianten MTX-5 und MTX-6 zeichnen sich jeweils durch Deletionen von 119 und 116 bp aus, die zur einer Verschiebung des Leserahmens und damit zur Generierung eines vorzeitigen Stopp-Codons an nt 1130-1132 bzw. nt 1133-1135 führen (s. 3.1.2). In der Nomenklatur für den MTX-1 entspricht diese Position ohne den Deletionen den Nukleotiden 1249-1251. Demnach ist das neu generierte Stopp-Codon nicht in den klonierten PCR-Fragmenten von MTX-5 und MTX-6 im pCR4 enthalten, die durch die Primer bedingt, nach der Nomenklatur des MTX-1 nur den Sequenzbereich 746-1222 umfassen.

Infolgedessen wurde eine Mutagenese-PCR mit dem Ziel der Sequenzverlängerung bis zum Stopp-Codon auf dem pCR4-MTX-5 746/1222 und pCR4-MTX-6 746/1222 durchgeführt.

Als Forward Primer diente der RK-MTX-746F und als reverser Primer wurde der MTX-1255 konstruiert, der sich aus der identischen Sequenz des Primers RK-MTX-1222R (20 nt) und weiteren 33 nt auf Grundlage der MTX-Sequenz bis nt 1255 zusammensetzt. Zudem modifiziert der Primer das Stopp-Codon TAA (nt 1249-1251) zu dem Stopp-Codon TAG, wodurch eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XbaI generiert wird (Abb. 23A).

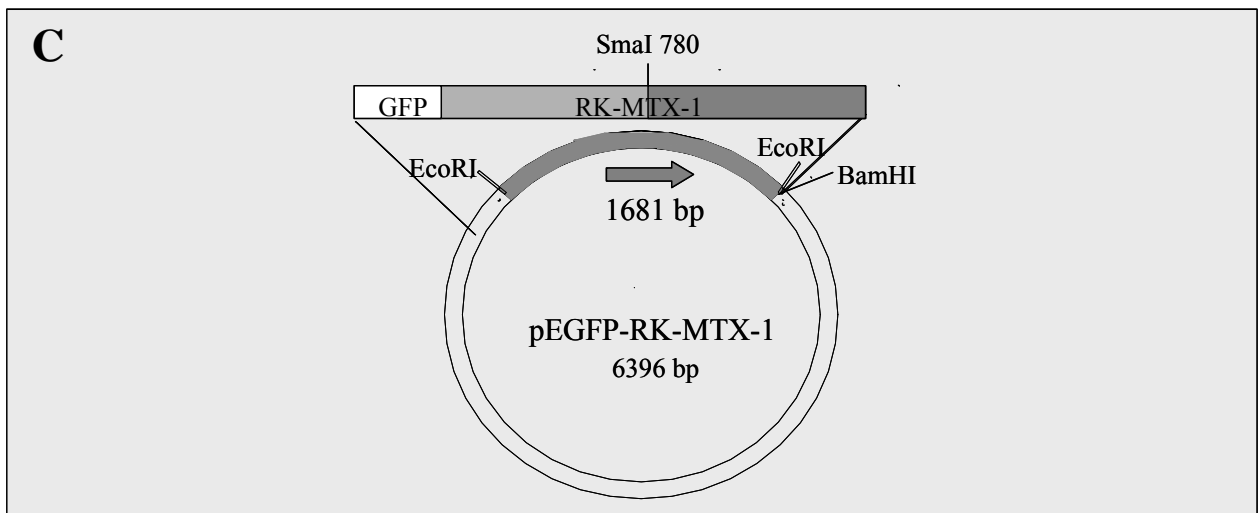
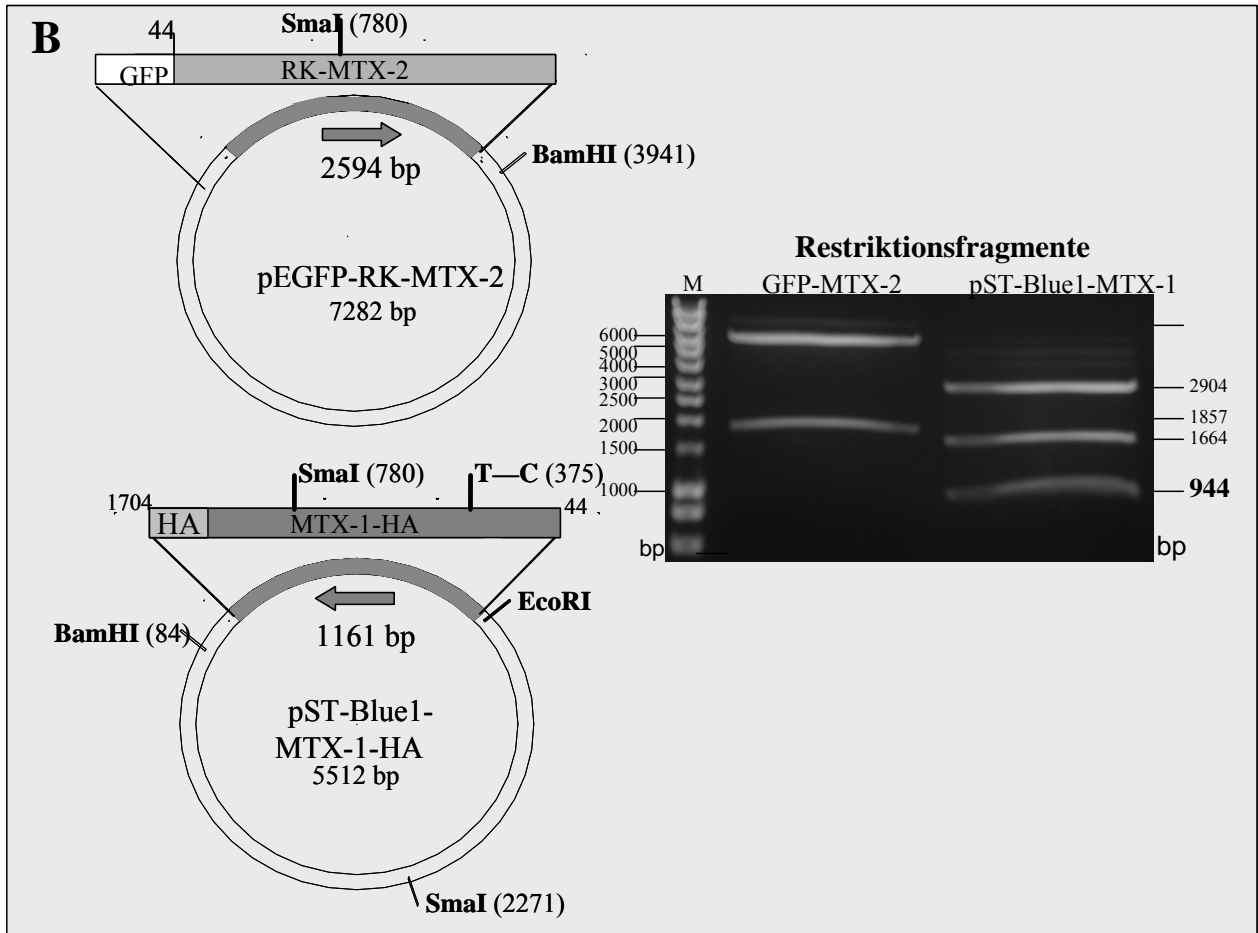
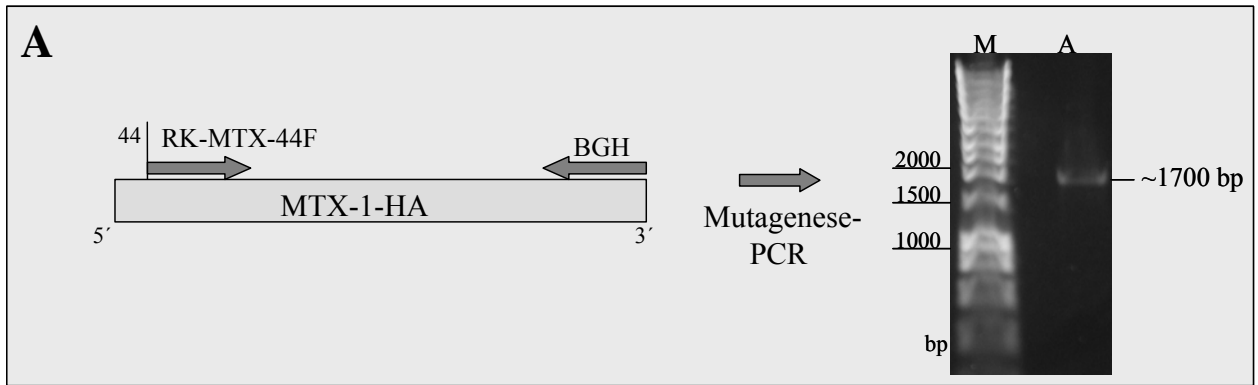


Abb. 22: Klonierungsstrategie zur Erstellung des pEGFP-RK-MTX-1

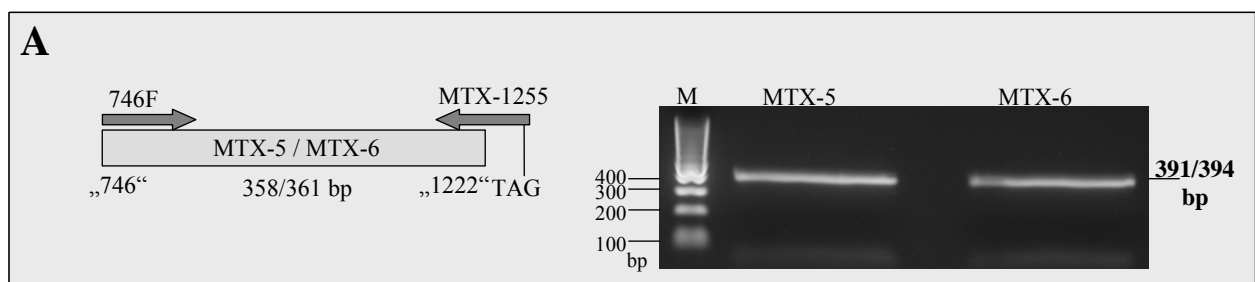
A) Aus 1ng Plasmid-DNA pCR3.1-MTX-1-HA wurde mit den Primern RK-44F und BGH das PCR-Produkt MTX-1-HA ab nt 44 in 20 Zyklen bei 60°C amplifiziert und im 0,7%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt [A]. Als Längenstandard diente der Hyperladder I [M].

B) Das PCR-Produkt wurde über TA-Cloning mit dem Vektor pST-Blue1 ligiert. Die MTX-1 relevante Sequenz von nt 780 - 3'-Ende wurde über BamHI und SmaI aus dem Vektor isoliert und der Vektor pEGFP-RK-MTX-2 ebenfalls mit diesen Enzymen restringiert, wodurch die Sequenz des MTX-2 von nt 780-3'-Ende aus dem Vektor entfernt wurde. Die Restriktionsfragmente wurden im 0,7%igen präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt [GFP-MTX-2, pST-Blue1-MTX-1]. Als Längenstandard diente der Hyperladder I [M].

C) Die Restriktionsfragmente der Größe von 5425 bp und 944 bp wurden über T4-Ligase ligiert.

Die amplifizierten PCR-Produkte (MTX-5/MTX-6 „746/1255“) entsprachen nach der Gelelektrophorese den erwarteten Produktgrößen von 382 bp und 385 bp und wurden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Zur Erstellung der GFP-Fusionsproteine musste die fehlende 5'-Sequenz bis nt 746 des MTX ergänzt werden. Dafür wurden die PCR-Produkte des MTX-5 und MTX-6 mittels der Restriktionsenzyme SmaI (nt 780) und XbaI (nt 1247) restringiert, um sie in den ebenfalls mit diesen Enzymen restringierten Vektor GFP-MTX-1 aus der Klonierung unter 3.3.1.2 (Rekognitionsstellen an nt 780 des Inserts und nt 1406 der mcs des Vektors) gerichtet einzufügen (Abb. 23B).

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente der PCR-Produkte des MTX-5 und MTX-6 und des Vektors GFP-MTX-1 bis zu nt 780 wurden mittels T4-Ligase ligiert. Nach Überprüfung der erfolgten Insertion durch eine Restriktionsanalyse mit EcoRI und XbaI (Restriktionsfragmente von 1128 bzw. 1131 bp) wurden je 2 Plasmide mit dem Primer 489F sequenziert. Außer der herbeigeführten Mutation des Stopp-Codons, konnte keine PCR-bedingte Mutation festgestellt werden. Auf diese Weise waren die cDNA Varianten des MTX-5 und MTX-6 ab nt 44 bis zum Stopp-Codon an nt 1130-1132 bzw. nt 1133-1135 erstellt und mit der DNA des GFP fusioniert.



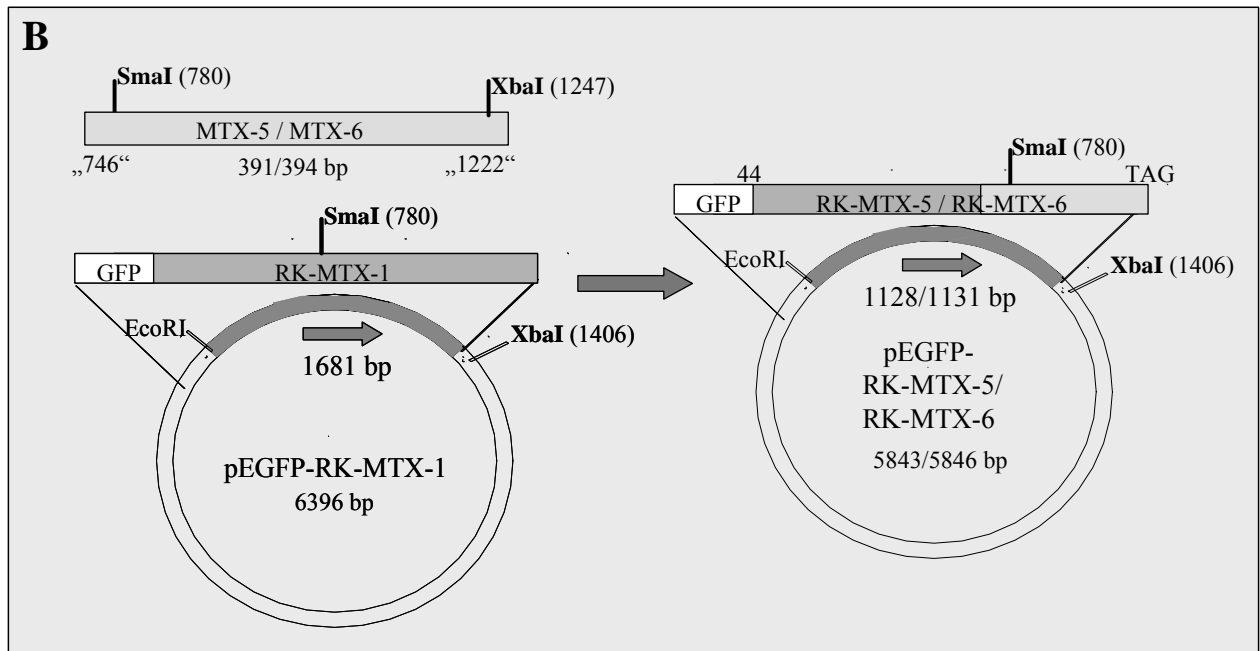


Abb. 23: Klonierungsstrategie zur Erstellung der Expressionsvektoren pEGFP-RK-MTX-5 und pEGFP-RK-MTX-6

A) Je 1 ng Plasmid-DNA pCR4-MTX-5 und pCR4-MTX-6 wurden mit den Primern 746F und MTX-1255 in 15 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60°C amplifiziert (s. Schema) und im 1,5%igen präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt [MTX-5, MTX-6]. Als Längenstandard diente die 100bp DNA Leiter [M].

B) Die PCR-Produkte des MTX-5 und MTX-6 wurden mit SmaI und XbaI restringiert und in den ebenfalls mit diesen Enzymen restringierten Vektor pEGFP-RK-MTX-1 über T4-Ligase eingefügt, bei dem durch die Restriktion die Sequenz nt 780 - 3'-Ende entfernt wurde. Die Restriktionsanalyse erfolgte mit EcoRI und XbaI.

4.3.2 Transiente Transfektion von MDCK-, COS-1- und HPCT-Zellen

Für die Untersuchungen zur Expression und subzellulären Lokalisation der Splicing-Varianten RK-MTX-1, -MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 wurden die Zelllinien MDCK, COS-1 und HPCT-Zellen transient transfiziert und in der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Die Zelllinien wurden unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, dass mit den MDCK und COS-1 2 alternative Nierenzelllinien analysiert werden konnten. Über RT-PCR konnte ausgeschlossen werden, dass sie eine oder mehrere der MTX-Varianten endogen exprimieren (nicht gezeigt). Somit konnten die MTX-Varianten auf ihre eigenständige Expression untersucht werden. Um eine gegebenenfalls akzessorische Funktion der Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 zu berücksichtigen, wurden HPCT-1E3 Zellen verwandt. Diese Hybridzelllinie aus primären Rattenhepatozyten und Fao Reuber Hepatoma Zellen H35 weist

ein nahezu identisches Expressionsprofil an Transportproteinen mit dem der Rattenleber auf (HALWACHS et al. 2005). Die endogene Expression von MTX-1 wurde hier über RT-PCR nachgewiesen. Dabei wurde ein weiteres PCR-Fragment amplifiziert, welches hinsichtlich des Molekulargewichts der Variante MTX-2 entspricht (Abb. 24).

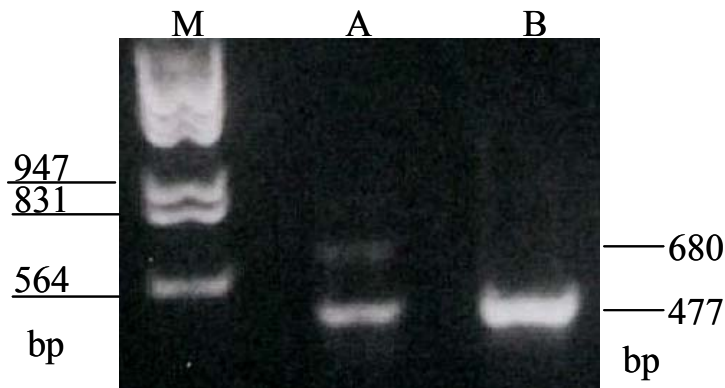


Abb. 24: Nachweis der endogenen mRNA Expression des MTX-1 in HPCT-1E3 Zellen

Unter Verwendung von 1 µg Gesamt-RNA der HPCT-1E3 Zellen wurden diese mittels RT-PCR mit den Primern RK-MTX-746F und RK-MTX-1222R bei 56°C in 30 Zyklen auf eine RNA-Expression des MTX überprüft. Das PCR-Produkt wurde im 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Längenstandard DNA Sizer III [M], PCR-Produkt aus der cDNA der HPCT-1E3 [A], PCR-Produkt der Positivkontrolle MTX-1 Plasmid-DNA mit theoretischer Produktgröße von 477 bp [B].

Die genannten Zelllinien wurden mittels der Transfektionsreagenzien GeneJuice und Nanofectin mit dem leeren Vektor pEGFP und den GFP-fusionierten Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 transient transfiziert und nach 24 h, 48 h und 72 h fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Dabei zeigte Nanofectin eine höhere Transfektionseffizienz und bessere Verträglichkeit. Die Auswertung der COS-1 und MDCK ergab im Vergleich der Zelllinien ein identisches Expressionsmuster der Varianten, so dass repräsentativ die Abbildungen der Transfektion mit Nanofectin der HPCT-1E3 und MDCK nach 24 h und 48 h in Abb. 25 gezeigt sind. Die Analyse wurde über den Zeitpunkt nach 48 h fortgeführt, wiewohl jedoch nicht grundsätzlich von den Beobachtungen zum Zeitpunkt 48 h nach der Transfektion ab.

In allen drei Zelllinien führte die Transfektion mit dem leeren Vektor pEGFP zu einer starken Fluoreszenz von 80% der Zellen. Das GFP wurde in der gesamten Zelle homogen exprimiert. Die Transfektion mit GFP-MTX-1 führte ebenfalls zu einer Expression in ca. 4/5 der Zellen, das Protein war nach 48 h in allen drei Zelllinien membranständig lokalisiert.

Im Gegensatz zu GFP und GFP-MTX-1 wurden die Fusionsproteine der Varianten MTX-2, -5 und -6 weniger effizient exprimiert (MTX-2 ~40%, GFP-MTX-5, -6 ~50% positive Zellen).

Die subzelluläre Lokalisation unterschied sich sowohl vom GFP als auch vom GFP-MTX-1. Nach 24 h waren GFP-MTX-2, MTX-5 und MTX-6 im gesamten Zytoplasma teils diffus verteilt, um nach 48 h im Zytoplasma in undefinierten Strukturen zu akkumulieren. Diese Umverteilung setzte sich bei gleichzeitig nachlassender Fluoreszenz im Zeitraum von 48 bis 72 h nach der Transfektion fort. Zwischen HPCT-1E3 und MDCK/ COS-1 konnten lediglich Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden. So war die Akkumulation von GFP-MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 in den MDCK/COS-1 ebenso wie die Lokalisation des MTX-1 in der Zellmembran teilweise bereits nach 24 h zu beobachten.

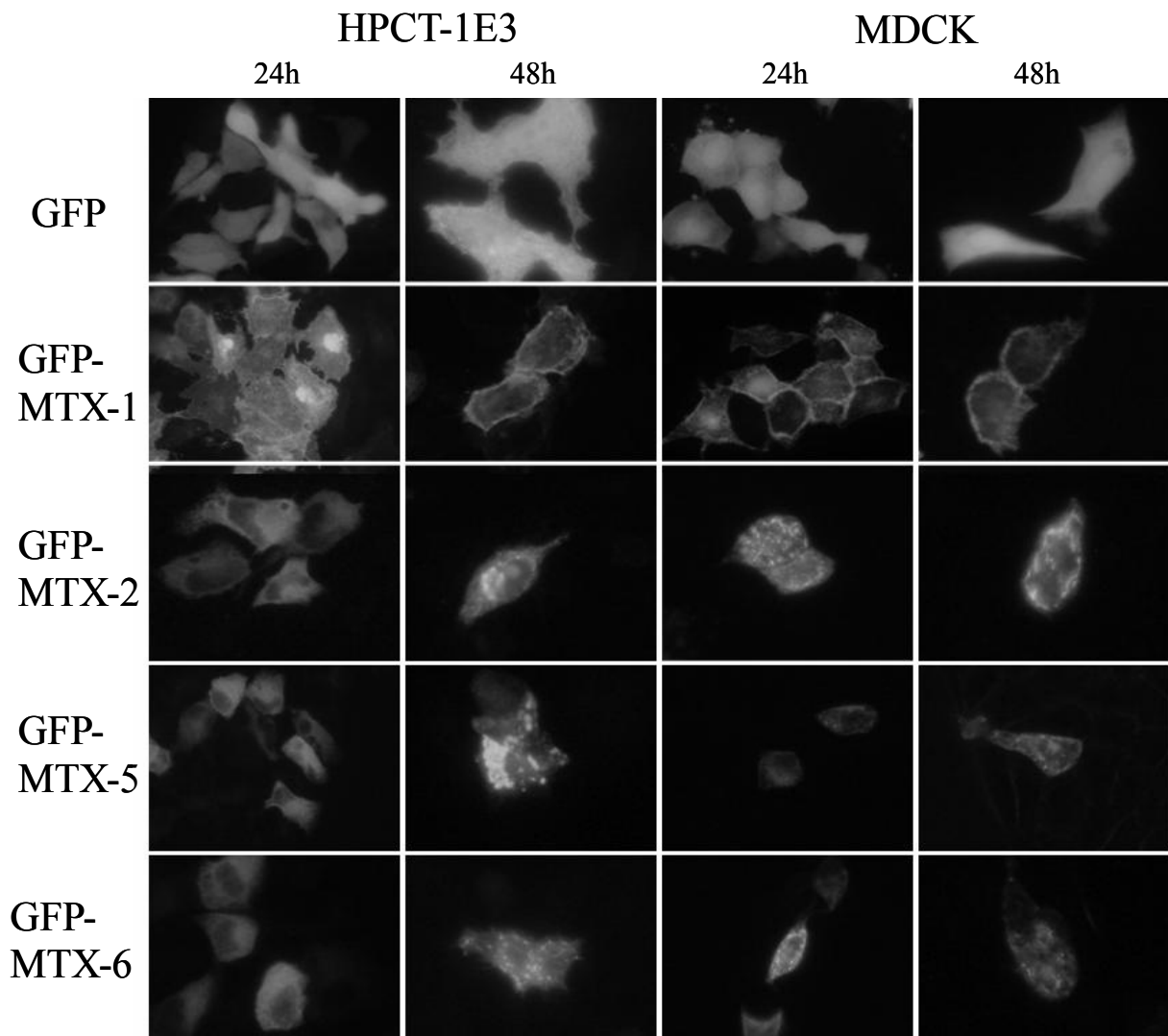


Abb. 25: Expression und subzelluläre Lokalisation der GFP-MTX-Varianten in HPCT-1E3 und MDCK über 24 h und 48 h

HPCT-1E3 und MDCK wurden mit dem leeren Vektor pEGFP und den GFP-MTX-Varianten GFP-MTX-1, -MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 h und 48 h nach

der Transfektion fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Für die Abbildung wurden repräsentative Bilder ausgewählt.

4.3.3 Stabile Transfektion von COS-1 und MDCK Zellen

Die Beobachtungen der transienten Transfektion der Zelllinien mit den GFP gekoppelten MTX-Varianten ließen keine Rückschlüsse dahingehend zu, inwieweit die nachlassende Fluoreszenz der Varianten GFP-MTX-2, -MTX-5 und MTX-6 auf eine Instabilität der mRNA- und/oder der Proteinexpression zurückzuführen waren. Um dies abschließend zu ermitteln, wurden die beiden Zelllinien MDCK und COS-1, die im Gegensatz zu HPCT-1E3 Zellen keine endogene mRNA-Expression der MTX-Varianten aufweisen, mittels des Transfektionsreagenz PEI mit den Expressionsplasmiden für alle GFP-MTX-Varianten und dem leeren Vektor pEGFP stabil transfiziert. Nach 2 Wochen Selektionsdruck unter G418 war die Selektion insofern abgeschlossen, dass keine Zellen mehr abstarben. Die Anzahl der resistenten Zellen war vergleichbar zwischen den mit dem leeren Vektor pEGFP und GFP-MTX-1 transfizierten und den mit den Varianten GFP-MTX-2, MTX-5 und MTX-6 transfizierten Zellen. Die Fluoreszenz der GFP und GFP-MTX-1 transfizierten Zellen war bis zum Tag 14 und darüber hinaus nachweisbar. Für die Varianten GFP-MTX-2, MTX-5 und MTX-6 war hingegen ab Tag 4 keine Fluoreszenz mehr detektierbar. Am Tag 14 wurden die mit GFP-MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 transfizierten Zellen mittels RT-PCR auf die mRNA-Expression überprüft. Durch die anhaltende Fluoreszenz des GFP-MTX-1 erübrigte sich ein Nachweis dessen mRNA-Expression.

Die Resultate zeigen, dass die mRNA der Varianten GFP-MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 14 Tage nach der Transfektion weiterhin in den transfizierten COS-1 und MDCK Zellen stabil exprimiert wurde (Abb. 26).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die mRNA aller GFP-MTX-Varianten in COS-1- und MDCK-Zellen stabil exprimiert wurde. Die mit GFP und GFP-MTX-1 transfizierten Zellen zeigten sowohl in der transienten als auch in der stabilen Transfektion das zu erwartende Ergebnis bezüglich subzellulärer Expression in Lokalisation und zeitlicher Verteilung. Die Varianten GFP-MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6 wurden in der transienten Transfektion sowohl in der eigenständigen (MDCK, COS-1) als auch in der akzessorischen Betrachtung (HPCT-1E3) nur kurzfristig exprimiert (48–72h). Sie waren teils inhomogen im Zytoplasma verteilt, akkumulierten nach 24-48 h in undefinierten subzellulären Strukturen

und wurden abgebaut. Nach 4 Tagen war keine Expression der jeweiligen Proteine mehr nachweisbar.

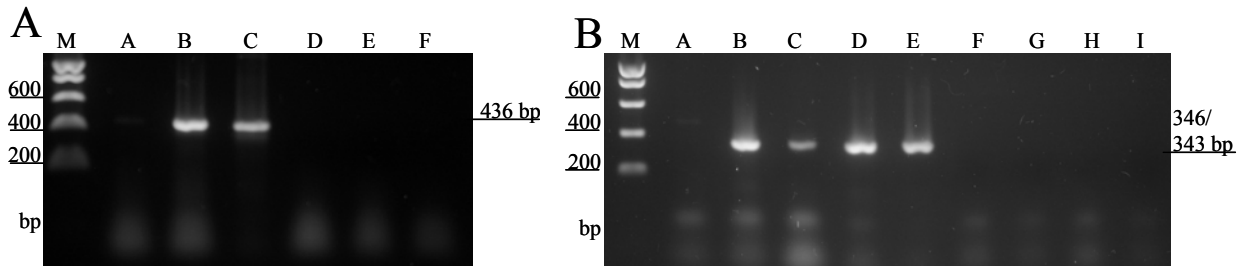


Abb. 26: Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2, MTX-5 und MTX-6 in stabil transfizierten COS-1 Zellen

Unter Verwendung von je 1 µg Gesamt-RNA der stabil transfizierten COS-1 Zellen wurde mittels RT-PCR bei 56°C in 30 Zyklen die mRNA-Expression von MTX-2, MTX-5 und MTX –6 nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente der DNA Sizer III [M].

A) Nachweis der mRNA-Expression von MTX-2 mit den Primern RK-MTX-794F und RK-MTX-2-1229R: cDNA aus COS-1-GFP [A], cDNA aus COS-1-GFP-MTX-2 [B], Positivkontrolle RK-MTX-2 Plasmid-DNA (theor. Produktgröße 463 bp) [C], Negativkontrollen: RNA aus COS-1-GFP [D] und COS-1-GFP-MTX-2 [E], H₂O [F].

B) Nachweis der mRNA-Expression von MTX-5 und MTX-6 mit den Primern RK-MTX-746F und MTX-1255: cDNA aus COS-1-GFP [A], cDNA aus COS-1-GFP-MTX-5 [B], cDNA aus COS-1-GFP-MTX-6 [C], Positivkontrolle MTX-5 Plasmid-DNA (theor. Produktgröße 343 bp) [D], Positivkontrolle MTX-6 Plasmid-DNA (theor. Produktgröße 346 bp) [E], Negativkontrollen: RNA aus COS-1-GFP [F], COS-1-GFP-MTX-5 [G] und COS-1-GFP-MTX-6 [H], H₂O [I]

5 DISKUSSION

Alternatives Spleißen ermöglicht die Generierung vielfältiger mRNA-Varianten und damit möglicher alternativer Proteinisoformen aus nur einem Gen. In vorangegangenen Studien wurden die full-length cDNAs der Transportproteine RL-MTX-1 und RK-MTX-1 aus Leber und Niere der Ratte isoliert und funktionell charakterisiert. Diese codierten für ein identisches Protein, wiesen jedoch Sequenzunterschiede in der 5'-UTR auf. (HONSCHA et al. 2000, KNEUER et al. 2004). Eine full-length cDNA mit einer Insertion von 203 bp wurde in der Leber identifiziert und als RL-MTX-2 bezeichnet (HONSCHA et al. 2000).

Aus der mRNA der Niere wurde mittels RT-PCR neben dem RK-MTX-1 ein PCR-Fragment isoliert und sequenziert, welches einer möglichen Variante RK-MTX-2 zugeordnet wurde (KNEUER et al. 2004). Ferner wurden 2 Fragmente höheren Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt, welche auf weitere mögliche Varianten RK-MTX-3 und RK-MTX-4 zurückzuführen sein könnten (Persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Walther Honscha, Leipzig, Juni 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Splicing-Varianten des MTX-Carriers der Ratte (rRfc) identifiziert und untersucht. Im Zuge dessen konnte das Gen des MTX-Carriers (slc19a1) im Rattengenom lokalisiert und seine genomische Organisation aufgeklärt werden (s. 5.1.2). Die detektierten Splicing-Varianten des MTX-Carriers wurden sowohl molekularbiologisch (s. 5.1) als auch zellbiologisch in Hinsicht auf eine funktionelle Aktivität charakterisiert (s. 5.2).

5.1 Molekularbiologische Charakterisierung alternativer Splicing-Varianten des MTX-Carriers (rRfc) unter Berücksichtigung methodischer Aspekte und Aufklärung der genomischen Organisation des MTX-Gens (slc19a1)

Die Detektion möglicher Splicing-Varianten des MTX-Carriers erfolgte über die Isolation der RNA aus der Rattenniere und nachfolgender RT-PCR. Hierbei wurden vier Fragmente (F1-F4) unterschiedlichen Molekulargewichts (ca. 500, 700, 850 bzw. 350 bp) elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.1.1). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen. Anhand der Ergebnisse konnten die Fragmente 1 und 2 den bereits beschriebenen cDNA-Varianten MTX-1 und MTX-2 aus der Leber zugeordnet werden. Für die Variante RK-MTX-2 wurde mittels RACE-PCR der full-length Klon erstellt (s. 4.1.2). Aus dem Fragment 4 leiteten sich 2 bisher nicht beschriebene cDNA-Varianten ab, die als

MTX-5 und MTX-6 bezeichnet wurden. Die möglichen Varianten MTX-3 und MTX-4 konnten unter Einbeziehung weiterführender Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Demnach ergaben sich für die Niere 4 mögliche Splicing-Varianten des MTX-Carriers (RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6). Ein Vergleich der Sequenzen dieser renalen Varianten und der bekannten Sequenzen der Varianten aus der Leber (RL-MTX-1, RL-MTX-2; HONSCHA et al. 2000) mit den Daten des Rat Genome Project führte zur Identifizierung des MTX-Gens sowie zur Aufklärung seiner genomischen Organisation (s. 4.1.4).

5.1.1 RK-MTX-2

Die Sequenzierung der cDNA-Fragmente aus der RT-PCR zeigte, dass das Fragment 1 mit 477 bp der Variante MTX-1 zuzuordnen war. Das Fragment 2 (680 bp) wies im Vergleich eine Insertion von 203 bp auf, welche mit der für den MTX-2 aus der Leber beschriebenen Sequenz (HONSCHA et al. 2000) übereinstimmte.

Zur Erstellung eines full-length Klons mittels RACE-PCR ist neben dem Adaptorprimer, der an die ligierte Adaptorsequenz am 3'- bzw. 5'- Ende bindet, ein genspezifischer Forward-Primer (5'-RACE-PCR) und ein genspezifischer Revers-Primer (3'-RACE-PCR) erforderlich (s. 3.2.1.8). Die cDNA des MTX-2 weist durch die Insertion eine spezifische Sequenz auf, die in der Variante MTX-1 nicht enthalten ist. Auf dieser Grundlage konnten MTX-2 spezifische Primer konstruiert werden, die sich komplementär zur Insertion verhielten. Dies ermöglichte die Gewinnung einer full-length cDNA des renalen MTX-2 (RK-MTX-2; s. 4.1.2). Während das 3'-Ende der cDNA über die Methode der 3'-RACE und anschließender PCR amplifiziert werden konnte, wurde mittels der 5'-RACE-PCR trotz verschiedener Optimierungsversuche kein spezifisches Produkt amplifiziert. Generell ist die Amplifikation des 5'-Endes mittels RACE-PCR kritischer als die 3'-RACE. Die Ursache liegt vermutlich darin begründet, dass der erste cDNA Strang vom 3'-Ende ausgehend amplifiziert wird. Auf diese Weise sinkt die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen 5'-Terminus. Darüber hinaus muss eine wesentlich höhere Anzahl an Nukleotiden amplifiziert werden. Speziell auf den MTX-2 bezogen liegt ein weiterer Grund der nicht erfolgreichen 5'-RACE möglicherweise in der geringen Menge des mRNA-Anteils dieser Variante an der Gesamt-RNA. Die Ergebnisse der RT-PCR (s. 4.1.1) zeigen, dass es einer hohen Zyklenzahl (40 Zyklen) bedurfte, um die Variante MTX-2 parallel zum MTX-1 zu amplifizieren und der MTX-2 deutlich geringer als der MTX-1 exprimiert wird (s. Abb. 4). Um dennoch die gesamte codierende Region des RK-MTX-2 und

Aufschluss über die 5'-UTR des renalen MTX-2 zu erhalten, musste demzufolge eine andere Methode entwickelt werden. Ziel war es, den unspezifischen Adaptorprimer durch einen genspezifischen Forward-Primer zu ersetzen. Derzeit war jedoch die 5'-Sequenz des RK-MTX-2 vor nt 746 unbekannt. Auf Basis der Erkenntnisse, dass sich die Sequenz des MTX-1 von Leber und Niere in der 5'-UTR unterschied (KNEUER et al. 2004) und die 5'-UTR des RL-MTX-2 mit der des RL-MTX-1 übereinstimmte (HONSCHA et al. 2000), wurde der Forward-Primer auf Grundlage der bekannten Sequenz des renalen MTX-1 konstruiert. KNEUER et al. (2004) lokalisierten das Start-Codon ATG für den RK-MTX-1 an nt 95. Im Falle identischer 5'-UTR von RK-MTX-1 und RK-MTX-2, würde sich der konstruierte Primer RK-MTX-44F vor dem vorhergesagten Start-Codon zur Sequenz nt 44-65 der 5'-UTR komplementär verhalten. Schon die Tatsache, dass sich mit diesem Forward-Primer und dem MTX-2 spezifischen Revers-Primer in der PCR ein Produkt amplifizieren ließ, stützte die Vermutung von identischen 5'-UTR der renalen Varianten MTX-1 und MTX-2. Die Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigte, dass die 5'-UTR identisch mit der des RK-MTX-1 und nicht mit der des RL-MTX-1 und RL-MTX-2 war. In der codierenden Region entsprach die Sequenz der full-length cDNA des RK-MTX-2 der des RL-MTX-2.

5.1.2 RK-MTX-3 und RK-MTX-4

Die Restriktionsanalyse und anschließende Sequenzierung des Fragments 3 (ca. 850 bp) aus der RT-PCR konnte keine neue cDNA-Variante mit einer PCR-Produktgröße von 850 bp bestätigen. So wurden in der Restriktionsanalyse Fragmente unterschiedlicher Größe elektrophoretisch aufgetrennt, die hinsichtlich des Molekulargewichts den Fragmenten der PCR-Produkte entsprachen (ca. 350 bp, 500 bp, 700 bp, 800 bp). In der Sequenzierung wurden ausschließlich Fragmente von 680 bp mit einer 100%igen Homologie zur Variante MTX-2 identifiziert. Aufgrund dessen wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Beim direkten PCR-Einsatz des isolierten DNA-Fragments 3 wurden anstelle eines singulären Produktes von 850 bp fünf verschiedene DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 6). Diese entsprachen hinsichtlich des Molekulargewichts wie schon zuvor in der Restriktionsanalyse (s. Abb. 5) den vorher detektierten Fragmenten 1 (MTX-1), 2 (MTX-2) und 4 (MTX-5/6). Die vermeintlich zusätzlichen DNA-Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 850 bp und ca. 1400 bp wurden zunächst als mögliche Variante „MTX-3“ und „MTX-4“ bezeichnet. In der nachfolgenden Analyse dieser DNA-Fragmente mittels Nested-PCR wurden dagegen keine Produkte mit dem entsprechenden

Molekulargewicht aufgetrennt. Stattdessen wurden jeweils 3 Fragmente aufgetrennt, die aufgrund der Molekulargewichte den Varianten MTX-1, MTX-2 und MTX-5/6 zuzuordnen waren.

Zusammenfassend wurden über Restriktionsanalyse und weiterführenden PCR-Analysen letztendlich nur Varianten identifiziert, die hinsichtlich des Molekulargewichts den Varianten MTX-1, MTX-2 und MTX-5/6 bzw. nach der Sequenzierung der klonierten Fragmente der höchsten Molekulargewichte nach der Restriktionsanalyse der Variante MTX-2 entsprachen. Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Banden von ca. 850 bp und ca. 1400 bp um PCR-Artefakte handelte und nicht einer Variante „MTX-3“ und „MTX-4“ zugeordnet werden können. Den Ergebnissen zufolge könnten die detektierten Banden auf strukturelle Konformationsänderungen der cDNA-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität zurückzuführen sein.

5.1.3 RK-MTX-5 und RK-MTX-6

Mit dem Fragment 4 (358/361 bp) aus der RT-PCR und dessen Sequenzierung wurden 2 bisher unbekannte cDNA-Varianten entdeckt, die wegen der zuvor vermuteten Varianten „MTX-3“ und „MTX-4“ als MTX-5 und MTX-6 bezeichnet wurden. Im Vergleich zur cDNA des MTX-1 wiesen die Varianten eine Deletion von 119 bp (MTX-5) und 116 bp (MTX-6) auf. Während die cDNA des MTX-2 durch die Insertion eine MTX-2 spezifische Sequenz aufweist, sind die cDNA Varianten MTX-5 und MTX-6 durch fehlende Sequenzen gekennzeichnet. Wegen der für diese Varianten fehlenden spezifischen Sequenzen konnten keine spezifischen Primer für die möglichen cDNA-Varianten RK-MTX-5 und RK-MTX-6 zur Erstellung der full-length cDNAs mittels RACE-PCR (s. 3.2.1.8) konstruiert werden. Für die alternativ konstruierten Primer MTX-5-1042R und MTX-6-1158R mit Komplementarität zu den flankierenden Sequenzen der jeweiligen Deletion konnte keine Spezifität erzielt werden (s. 4.1.3). In Kombination mit dem MTX spezifischen Forward-Primer RK-MTX-746F konnten in der PCR beim Einsatz der MTX-5/MTX-6 Plasmid-DNA und den jeweiligen Primern MTX-5-1042R/MTX-6-1159R DNA-Fragmente des zu erwarteten Molekulargewichts amplifiziert werden. Es zeigte sich jedoch, dass beim Einsatz von MTX-1 Plasmid-DNA ebenfalls in der jeweiligen Primerkombination ein DNA-Fragment amplifiziert wurde. Dieses entsprach hinsichtlich des Molekulargewichts den DNA-Fragmenten der Varianten MTX-5 und MTX-6 (s. Abb. 12).

Dieses Ergebnis lässt sich über zwei verschiedene Erklärungsansätze interpretieren (Abb. 27): zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Sequenz der Deletion von 119 bp bzw. 116 bp mit dem jeweiligen Primern für den MTX-5 und MTX-6 in der MTX-1-Plasmid-DNA „überlesen“ wurde (Variante A). Anderenfalls könnte die komplementäre Sequenz der Primer MTX-5-1042R und MTX-6-1158R in 5'-Richtung der Deletion zur Primeranlagerung an die MTX-1 Plasmid-DNA ausgereicht haben (Variante B). In beiden Fällen ergeben sich für die MTX-1 cDNA PCR-Produkte der gleichen Größe wie für die Varianten MTX-5 und MTX-6. Unabhängig von der Ursache hätte schließlich bei Verwendung dieser Primer in einer RT-PCR oder RACE-PCR nicht unterschieden werden können, ob die cDNA des MTX-5/MTX-6 oder die des MTX-1 amplifiziert würde. Folglich eigneten sich die Primer nicht zur spezifischen Amplifikation der Varianten MTX-5 und MTX-6.

Zur Erstellung der full-length cDNA des MTX-5 und MTX-6 bestand prinzipiell die Möglichkeit eine RACE-PCR mit MTX-1 spezifischen Primern durchzuführen. Dies wäre in der Erwartung geschehen, die in dieser Arbeit detektierten cDNA-Varianten würden gleichzeitig mit amplifiziert werden. Aus folgenden Gründen wurde dieser methodische Ansatz nicht in Erwägung gezogen: bei der Erstellung der full-length cDNA des RL-MTX-1 mittels RACE-PCR durch HONSCHA et al. (2000) wurde der RL-MTX-2 nicht mit amplifiziert, obwohl sich die verwendeten Primer auch zu dessen Sequenz komplementär verhielten. Gleichmaßen wurden bei der Erstellung der full-length cDNA des RK-MTX-1 keine weiteren Varianten des MTX-1 identifiziert (KNEUER et al. 2004). Dort erfolgte der PCR-Nachweis des renalen MTX-2 mit einem Primer, der aus der bekannten Insertion des MTX-2 aus der Leber abgeleitet wurde und damit spezifisch für den MTX-2 war. In der vorliegenden Arbeit konnten die cDNA-Varianten des RK-MTX über RT-PCR nur unter Verwendung eines Primerpaares mit PCR-Produkten unter 1000 bp bei einer hohen Zyklenzahl (40 Zyklen) und abgesenkter Temperatur (54°C) nachgewiesen werden (s. 4.1.1). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der geringen Menge der mRNA-Varianten RK-MTX-2, -MTX-5 und -MTX-6.

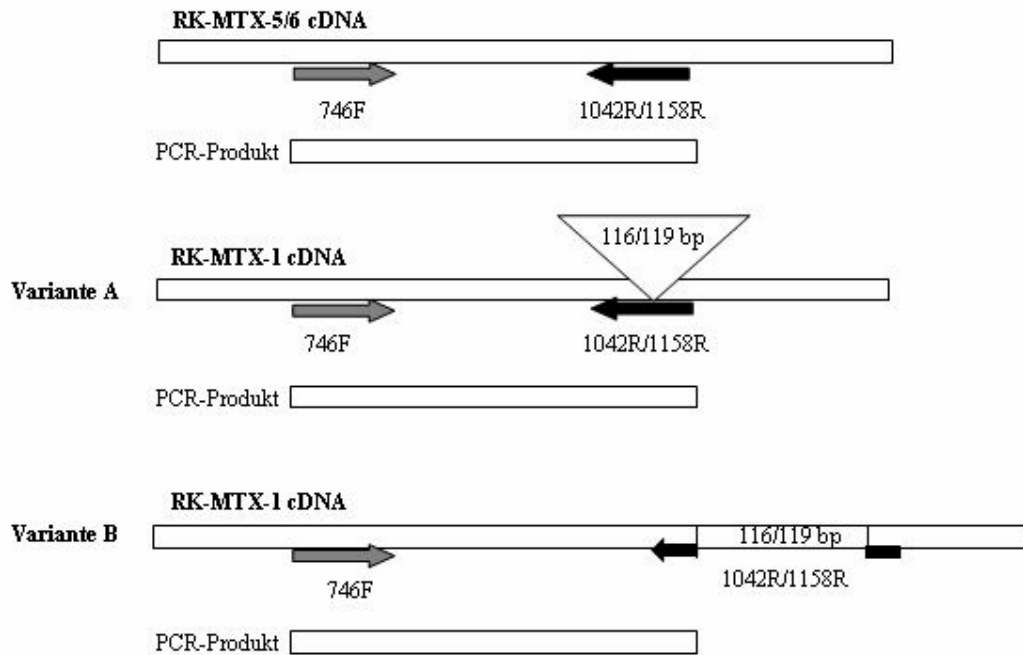


Abb. 27: Mögliche Ursachen der fehlenden Spezifität der Primer MTX-5-1042R bzw. MTX-6-1158R

Mit den Primern MTX-5-1042R und MTX-6-1158R wurde mit der MTX-1 Plasmid-DNA ein PCR Produkt gleicher Größe wie mit der Plasmid-DNA des MTX-5 und MTX-6 amplifiziert.

Variante A: Vollständige Primeranlagerung unter Ausschluss der dazwischenliegenden Sequenz von 119 bp (MTX-5-1042R) / bzw. 116 bp (MTX-6-1158R)

Variante B: Partielle Primeranlagerung in 5'-Richtung der Deletionssequenz des MTX-5 / MTX-6

Das Primerpaar war zudem sequenznah um die jeweiligen Deletionen des MTX-5 und MTX-6 bzw. der Insertion des MTX-2 lokalisiert. In Anbetracht dessen, dass die Bande der Varianten MTX-5/MTX-6 im Agarosegel nur sehr schwach ausgeprägt war (s. Abb. 4) und in der 3'- und 5'-RACE-PCR Produktgrößen von ca. 1200-1500 bp zu erwarten waren, wäre die Aussicht auf Erstellung der full-length cDNA des RK-MTX-5 und RK-MTX-6 mittels RACE-PCR selbst bei möglicher Nutzung von MTX-5 bzw. MTX-6 spezifischen Primern gering, mit MTX-Primern nahezu ausgeschlossen. Ferner wären die Produktgrößen nahezu identisch und daher die Varianten gelelektrophoretisch nicht zu trennen gewesen.

Um die Varianten dennoch zellbiologisch charakterisieren zu können, musste eine methodische Alternative entwickelt werden. Zur Konstruktion der GFP-Fusionsproteine der Varianten MTX-5 und MTX-6 wurden die PCR-Fragmente mittels Mutagenese-PCR in 3'-Richtung bis zum vorausgesagten Stopp-Codon verlängert und über Klonierung an die 5'-Sequenz des RK-MTX-1 angefügt (s. 4.3.1.3). Auf diese Weise konnten für die

nachfolgenden Untersuchungen die jeweils vollständigen codierenden Sequenzen der cDNA-Varianten RK-MTX-5 und RK-MTX-6 gewonnen werden.

5.1.4 Genomische Organisation des MTX-Gens der Ratte und Identifizierung der Splicing-Varianten RL-/RK-MTX-1, RL-/RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6

Die Orthologie des MTX-Carriers mit dem RFC konnte bisher durch funktionelle Studien und Vergleiche der Aminosäuresequenzen durch KNEUER u. HONSCHA (2004) nachgewiesen werden. Während das Gen für den RFC (*Rfc*) von Mensch, Maus und Hamster lokalisiert werden konnte (CHAN et al. 1995, MOSCOW et al. 1995, ROY et al. 1998), war die Lokalisation des MTX-Gens der Ratte jedoch bislang unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte das MTX-Gen (*rat slc19a1*) auf Grundlage der bekannten und hier neu detektierten MTX-cDNA Sequenzen aus Leber und Niere auf Chromosom 20p12 lokalisiert und seine genomische Organisation aufgeklärt werden. Gleichzeitig konnten die cDNA-Varianten auf den Vorgang des alternativen Spleißens zurückgeführt werden (s. 4.1.4).

Es wurden 2 alternative nicht codierende Exons (Exon I und Ia) und 5 codierende Exons (Exon II-VI) identifiziert. Das Start-Codon ist laut Vorhersagen in Exon II, das Stopp-Codon in Exon VI lokalisiert. Die Genstruktur korreliert damit weitestgehend mit der für den humanen (*hRFC*), murinen *Rfc* und dem *Rfc* vom Hamster beschriebenen genomischen Organisation (MURRAY et al. 1996, TOLNER et al. 1997, TOLNER et al. 1998, WILLIAMS u. FLINTHOFF 1998, ZHANG et al. 1998). Mit Ausnahme des dritten Introns befanden sich die Exon-Intron-Grenzen in Übereinstimmung mit der GT-AG-Regel (s. 2.4). Die Abweichung von der GT-AG-Regel der 5'-Splice-Site des Introns II (C statt T) wurde gleichermaßen für das korrelierende dritte Intron des *rfc*-Gens *slc19a1* des Hamsters (MURRAY et al. 1996), der Maus (TOLNER et al. 1997) und des humanen RFC-Gens *SLC19A1* (WILLIAMS u. FLINTHOFF 1998) beschrieben.

Mit Kenntnis der genomischen Organisation des MTX-Gen können nun auch die mRNA Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5, MTX-6 sowie die Unterschiede in der 5'-UTR erklärt werden.

5.1.4.1 RL-MTX und RK-MTX (-1, -2)

Die unterschiedlichen 5'-UTR der MTX-Varianten aus Leber und Niere erschließen sich durch die alternative Nutzung der Exons I und Ia.

Für den murinen und den Rfc des Hamsters wurden durch MURRAY et al. (1996) und TOLNER et al. (1997) ebenfalls 2 alternative nicht codierende Exons identifiziert, aber nicht eingehender untersucht. Im Falle des MTX-Carrier ist anhand der Ergebnisse anzunehmen, dass der Prozess des alternativen Spleißens der Exons I und Ia gewebspezifisch erfolgt, denn sowohl die Variante MTX-1 als auch die Variante MTX-2 zeichneten sich abhängig vom Gewebe durch identische 5'-UTRs aus. Die Transkription des Exon I erfolgt in der Niere, die des Exon Ia in der Leber und ist durch die Erststellung der full-length cDNA-Varianten für MTX-1 und MTX-2 nachgewiesen. Für die Varianten MTX-5 und MTX-6 der Niere ist die Transkription des Exons I demzufolge wahrscheinlich. Neben den zunächst identifizierten zwei alternativen nicht codierenden Exons des humanen RFC (TOLNER et al. 1998, ZHANG et al. 1998), wurden in weiterführenden Studien durch FLATELEY et al. (2004) weitere nicht codierende Exons beschrieben. Auch beim MTX-Gen ist die Existenz weiterer Exons für die 5'-UTR nicht ausgeschlossen. HONSCHA u. PETZINGER (1999) wiesen die Expression des MTX-1 in weiteren Organen nach, über deren 5'-UTR bislang keine Aussagen getroffen werden konnten. Unterschiedliche 5'-UTR deuten auf eine zell- und gewebspezifische Regulation der Genexpression hin, wie sie MATHERLY u. GOLDMAN (2003) auch für den hRFC postulierten. Die ursächlichen Faktoren und die sich daraus ergebenden Konsequenzen sind bisher jedoch nicht erschlossen. Über vergleichende funktionelle Studien der Expression von cDNA-Varianten mit unterschiedlichen 5'-UTR aber gleicher codierender Sequenzen, könnten weiterführende Erkenntnisse auf dem Gebiet der Regulation der Genexpression gewonnen werden.

Der hepatozellulär exprimierte MTX-1 der Ratte weist in der 5'-UTR eine sog. „Barbie Box“ auf, welche bislang nur bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Cytochrom P450 Familie nachgewiesen wurde (HONSCHA et al. 2000). Interessanterweise konnten HONSCHA et al. 2000 zeigen, dass die Vorbehandlung von Ratten mit dem Prototyp der „Barbie Box“- Induktoren Phenobarbital zu einer Reduktion der RL-MTX-1vermittelten MTX-Aufnahme führte. Diese über Barbiturate regulierbare Nukleotidsequenz fehlt in der 5'-UTR des renalen Transportproteins, jedoch wurde der Einfluss von Phenobarbital auf die RK-MTX-1 vermittelte MTX-Aufnahme bislang nicht untersucht. Im Rahmen weiterführender Studien zum Regulationsmechanismus des RL-MTX-1 durch Phenobarbital-artige Induktoren

konnten jedoch HALWACHS et al. (2007) inzwischen zeigen, dass die reduzierte Transporteraktivität durch eine Proteinkinase C-vermittelte posttranslationale Modifikationen bedingt ist. Eine Beteiligung der „Barbie Box“ ist unwahrscheinlich, da nach Phenobarbital-Vorbehandlung keine Reduktion der RL-MTX-1-Transkription oder -Translation beobachtet wurde.

Hingegen könnte die unterschiedliche Expressionsrate des MTX-1 in Leber und Niere auf die gewebsspezifische Regulation über die unterschiedlichen 5'-UTR zurückzuführen sein.

5.1.4.2 RL/RK-MTX-2

Die Insertion von 203 bp des MTX-2 aus Leber und Niere erklärt sich anhand der genomischen Organisation des MTX-Gens aus der Retention des Intron III, das die nach der GT-AG-Regel typischen sog. „Splice-Sites“ aufweist. Eine Kontamination mit genomischer DNA in der RT-PCR wurde durch die durchgeführten Kontrollen (s. 3.2.1.7) ausgeschlossen. Im Vergleich zu den anderen Introns mit ca. 500 bp (Intron I), 1000 bp (Intron IV) und 4000 bp (Intron Ia, Intron II, Intron V) ist das Intron III mit 203 bp verhältnismäßig kurz. Hinsichtlich des humanen Genoms ist bekannt, dass Introns mit < 100 bp zu ca. 95% transkribiert werden, die Häufigkeit der Retention nimmt mit der Länge des Introns ab (MICHAEL et al. 2005). Insgesamt ist im humanen Genom die Intronretention eine relativ seltene Form des alternativen Spleißens, die bisher für ca. 2-5% der Gene beschrieben wurden (CLARK u. THANARAJ 2002, KAN et al. 2002). Bei Pflanzen wurde der Anteil dieser Splicing-Form mit ca. 30% beziffert. Davon betrafen aber ca. 65% der nicht gespleißten Introns die UTR bzw. das letzte Intron (NER-GAON et al. 2004) und nicht die codierende Region.

Im Fall des MTX-2 ist die Intronretention in der codierenden Region lokalisiert. Durch die Insertion wird ein vorzeitiges Stopp-Codon generiert, dass in der Folge zu einem verkürzten Protein mit nur 7 statt 12 TMD führt (s. 2.3.3).

Die für die RT-PCR verwendeten Primer verhalten sich komplementär zu Sequenzen des Exon III (RK-MTX-746F) und IV (RK-MTX-1222R), die das Intron III einschließen. Damit ist auch auf genomischer Grundlage ausgeschlossen, dass sich in diesem Bereich über eine RT-PCR weitere Fragmente hätten amplifizieren lassen, die ein höheres Molekulargewicht als das des MTX-2 (mit Intron III) aufwiesen. Dies steht im Einklang mit der zuvor verfassten These, dass die vermuteten Fragmente MTX-3 und MTX-4 PCR-Artefakte darstellen.

5.1.4.3 RK-MTX-5 und RK-MTX-6

Die Varianten MTX-5 und MTX-6 hingegen resultieren aus den verkürzten Exons IIIa und IVa und können auf alternatives Spleißen zurückgeführt werden.

Schon nach der Sequenzierung konnte ein Zusammenhang zwischen der Insertion des MTX-2 und den Deletionen des MTX-5 und MTX-6 festgestellt werden. So endete die Deletion des MTX-5 mit Beginn der Insertion, während die Deletion des MTX-6 an der Insertion begann (s. 4.1.1). Auf Grundlage der genomischen Organisation und der Kenntnis, dass es sich bei der Insertion des MTX-2 um das Intron III handelt, wird im Fall des MTX-5 die 5'-Splice-Site des Intron III und im Fall des MTX-6 dessen 3'-Splice-Site genutzt. Darüber hinaus kommt es zur Nutzung zusätzlicher Splice-Sites im Exon III (MTX-5) und Exon IV (MTX-6), die die jeweiligen Exons zu den Exons IIIa und IVa verkürzen. Die hier postulierten Splice-Sites befinden sich in Übereinstimmung mit der GT-AG-Regel, wobei jeweils eine des Introns III und eine zusätzliche Splice-Site im Exon III bzw. Exon IV genutzt wird.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten TOLNER et al. (1997) ein ebenfalls verkürztes Exon III in der genomischen Struktur des mRfc identifizieren. Ein verkürztes Exon IV wurde bislang nicht beschrieben, hingegen aber zusätzliche Splice-Sites im 6. Exon des humanen RFC (DRORI et al. 2000b) und im 4. und 5. Exon des mRfc (BRIGLE et al. 1997). Eine Deletion von 26 bp im Transkript des haRfc ist möglicherweise ebenfalls auf die Nutzung einer zusätzlichen Splice-Site zurückzuführen (MURRAY et al. 1996).

In der Folge bewirken die fehlenden Sequenzen von 119 bzw. 116 bp des MTX-5 und MTX-6 eine Verschiebung des Leserahmens und damit zu einer vom MTX-1 abweichenden neuen Aminosäuresequenz. In beiden Splicing-Varianten wird ein vorzeitiges Stopp-Codon in Exon V generiert. Dies würde zur Translation eines verkürzten Proteins mit nur 6 TMD (MTX-5) bzw. 7 TMD (MTX-6) führen.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit alle in 2.4 aufgeführten Formen des alternativen Spleißens am MTX-Carrier nachgewiesen und die cDNA-Varianten anhand dieser als Splicing-Varianten definiert werden. Die Unterschiede in der 5'-UTR der MTX-Varianten aus Leber und Niere erklären sich aus der Nutzung der alternativen Exons I und Ia, die Variante MTX-2 durch die Retention des Intron III und die Varianten MTX-5 und MTX-6 durch die Nutzung alternativer 5'- und 3'- Splice-Sites in Exon III und IV.

Mittels RT-PCR wurden mit dem für die Niere verwandten Primerpaar auch in Lunge und Milz DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, die dem Molekulargewicht der Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5/6 entsprachen (s. 4.1.1). Aufgrund dessen ist ein Vorkommen der für die Niere nachgewiesenen Splicing-Varianten auch in weiteren Geweben wahrscheinlich. Weitere alternative Splicing-Varianten des MTX-Carriers, sowohl die UTR als auch die codierende Region betreffend, sind denkbar. Diese ließen sich beispielsweise über RT-PCR mit Primerkombinationen ermitteln, die sich zu anderen als den hier untersuchten Sequenzabschnitt (Exon III- Exon IV) komplementär verhalten.

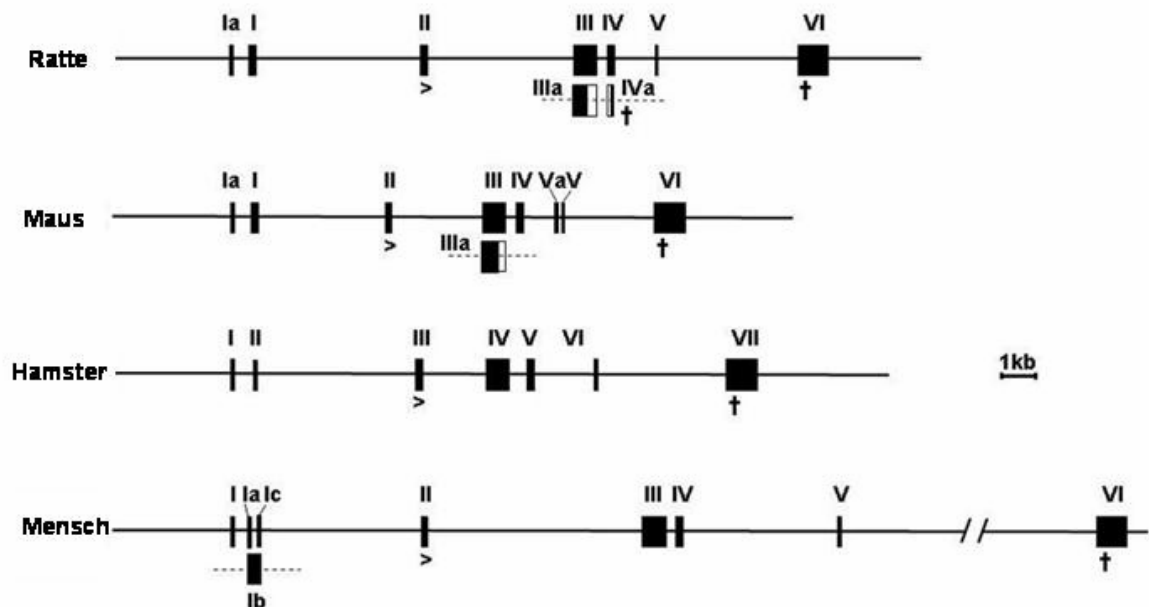


Abb. 28: Vergleich der genomischen Organisation des Gens *slc19a1/SLC19A1* von Ratte, Maus, Hamster und Mensch

Die Darstellung der genomischen Organisation des Gens von Mensch, Maus und Hamster basieren auf den Daten von MURRAY et al. (1996), TOLNER et al. (1997) und WILLIAMS u. FLINTOFF (1998). Exons sind als Kasten, Introns als durchgehende Linie gezeigt. Verkürzte Exons sind mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Symbole > und † bezeichnen das vorausgesagte Start- und Stopp-Codon.

5.2 Zellbiologische Charakterisierung der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6

Die cDNA-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 konnten molekurbologisch dahingehend charakterisiert werden, dass sie alternative Splicing-Varianten des MTX-Carriers sind. Durch vorzeitige Stopp-Codons in der codierenden Region sind die Protein-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 laut Proteinvorhersage im Vergleich zum MTX-1 C-terminal verkürzt (s. 4.1 u. 5.1). Ausgehend von den für den MTX-1 vorhergesagten 12 TMD fehlen den Varianten der C-Terminus sowie die TMD 7-12 (MTX-5) bzw. TMD 8-12 (MTX-2, MTX-6). Das Fehlen der TMD 7 bei der Variante MTX-5 führt zu einer Lokalisation ihres C-Terminus im Zytosol. Die C-terminale Verkürzung der Varianten bedeutet den Verlust bedeutsamer funktioneller und struktureller Komponenten des Transportproteins (s. 2.3.3). HOU et al. (2006) wiesen den TMD 7, 8, 10 und 11 wichtige Bedeutung zu, insbesondere der TMD 11, in der die Substratbindungsdomäne lokalisiert wurde.

Auch der intrazellulären Schlaufe wird große strukturelle Bedeutung beigemessen (SADLISH et al. 2002, SHARINA et al. 2002). Die Lokalisation der Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 könnte auf eine Funktion bezüglich der Stabilität des Proteins deuten, da sie die 2 symmetrischen je 6 TMD umfassenden Hälften des Proteins verbindet. Die große intrazelluläre Schlaufe zwischen TMD 6 und 7 bleibt bei den Varianten MTX-2 und MTX-6 erhalten. Auch bei der Variante MTX-5 bleibt die Sequenz der Schlaufe erhalten, jedoch fehlt die TMD 7. Die Schlaufe ist insofern in den Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 nicht mehr zentral sondern C-terminal lokalisiert. Damit ist es wenig wahrscheinlich, dass die Schlaufe bei den Varianten noch von großer struktureller Bedeutung für die Proteinstabilität ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der molekularbiologischen Charakterisierung der Splicing-Varianten auch untersucht, welche funktionelle Bedeutung den Splicing-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 zukommt. Die funktionelle Aktivität des RK-MTX-2 wurde über die Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Methotrexat in stabil mit der cDNA des RK-MTX-2 transfizierten MDCK Zellen ermittelt und die zellassozierte Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt (s. 4.2.2.2).

Zum Nachweis der Proteinexpression des RK-MTX-2 und die Ermittlung der subzellulären Lokalisation des Proteins wurde die cDNA um einen HA-Tag erweitert und MDCK Zellen

mit dieser modifizierten cDNA stabil transfiziert. Diese Zellen wurden mittels Westernblot und indirekter Immunfluoreszenz analysiert (s. 4.2.3).

Zur vergleichenden Analyse der Proteinexpression und der subzellulären Verteilung der möglichen Proteinvarianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 wurden GFP-Fusionsproteine konstruiert (s. 4.3.1). Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch in 3 verschiedenen Zelllinien (MDCK, HPCT, COS-1), die mit den Varianten transfiziert wurden (s. 4.3.2, 4.3.3). Untersuchungen zur RNA-Expression transfizierter cDNAs erfolgten in dieser Arbeit mittels RT-PCR.

5.2.1 Funktionelle Untersuchungen zur Transportaktivität des RK-MTX-2

Um festzustellen, inwieweit trotz des Fehlens C-terminaler Strukturen eine funktionelle Aktivität der möglichen Translationsprodukte besteht, wurde die Variante RK-MTX-2 auf eine MTX-Transportaktivität überprüft (s. 4.2). Im Gegensatz zum RK-MTX-5 und RK-MTX-6 ergab sich durch die Intronretention die Möglichkeit zur Erstellung der full-length cDNA mittels MTX-2 spezifischer Primer (s. 4.1.2). Dies bot den Vorteil, dass keine Modifikationen an der MTX-2 cDNA vorgenommen werden mussten, die möglicherweise Einfluss auf die Ergebnisse hätten nehmen können. Als *in vitro*-Modell dienten MDCK-Zellen, die keine der MTX-Varianten endogen exprimieren. Diese wurden mit der full-length cDNA des RK-MTX-2 stabil transfiziert, um eine mögliche Transportaktivität der Proteinvariante für das MTX-1 Markersubstrat MTX zu ermitteln (s. 4.2.2.1)

Vor Bestimmung der funktionellen MTX-2-Aktivität wurde die Expression von RK-MTX-2-RNA in den stabil transfizierten MDCK-Zellen überprüft. Die Resultate zeigen, dass trotz der Ausbildung einer Resistenz gegen G418 nur 5 von 9 überprüften Einzelzellklonen eine mRNA-Expression des RK-MTX-2 aufwiesen (s. Abb. 17). Da in Vorversuchen die geringst notwendige Konzentration an G418, die zum Absterben der Zellen führt, in untransfizierten MDCK-Zellen getestet wurden (s. 3.2.3.4.1), ist die mögliche Ursache nicht aus einer zu geringen Konzentration an G418 herzuleiten.

Das Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit, stabil transfizierte Zellen trotz G418-Resistenz auf die RNA-Expression der transfizierten cDNA zu kontrollieren. Eine Unterlassung der Kontrolle könnte zu unzulässigen Rückschlüssen funktioneller Ergebnisse und zu falsch negativen Resultaten führen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur funktionellen Untersuchung des RK-MTX-2 die mRNA-positiven Einzelzellklone verwandt.

In der vorliegenden Studie wurde für einen der fünf mRNA-positiven Zellklone (S-5) eine Transportaktivität für MTX nachgewiesen (s. 4.2.2.2). Die vier anderen Zellklone zeigten hingegen, genau wie die als Negativkontrolle eingesetzten untransfizierten MDCK-Zellen, keine Aufnahmeaktivität für MTX. Der Zellklon S-5 wies gegenüber den anderen verwendeten Zelllinien veränderte phänotypische Eigenschaften auf. Dies ist dadurch zu erklären, dass auch bei stabilen Zelllinien, wie den hier verwendeten MDCK-Zellen, geringe individuelle Unterschiede der Einzelzellen hinsichtlich der genetischen und biochemischen Ausstattung möglich sind (REES et al. 1996). Da die mit der cDNA des RK-MTX-2 stabil transfizierten MDCK-Zellen einer Selektion stabiler Einzellzellklone unterzogen wurden (s. 3.2.3.4.2), ist eine Zelllinie mit phänotypisch veränderten Eigenschaften möglich. Ein anderer Phänotyp kann ferner auch durch den Ort der Insertion der Fremd-DNA bedingt sein. Der Zellklon S-5 zeichnete sich gegenüber den anderen Zelllinien durch ein schnelleres Wachstum aus und führte damit zu abweichenden Versuchsbedingungen (s. 4.2.2.2). Die MTX-Aufnahme wurde zwar auf die Einheit pmol/mg Protein normiert, andererseits bedeutet das schnelle Wachstum der Zellen einen entsprechend erhöhtem Bedarf an Substraten zur Biosynthese von Nukleinsäure-Vorstufen. Es ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass die MTX-Aufnahme des Zellklons S-5 über den RK-MTX-2 vermittelt wurde, aber auch eine aktive Aufnahme des Antimetaboliten MTX über andere Aufnahmemechanismen wie z.B. über den Folatezeptor (s. 2.2.3) ist denkbar. Schlußfolgernd kann die nachgewiesene Aufnahmeaktivität des phänotypisch abweichenden Zellklons S-5 nicht als repräsentativ für eine mit RK-MTX-2 transfizierte Zelllinie gewertet werden.

Der Nachweis der mRNA-Expression des RK-MTX-2 der transfizierten MDCK-Zellen ließ noch keine Rückschlüsse auf die Proteinexpression zu. In Ermangelung kommerziell erhältlicher Antikörper wurde die cDNA des RK-MTX-2 mit einem HA-Tag versehen (MTX-2-HA), um die Proteinexpression in mit der modifizierten cDNA transfizierten MDCK-Zellen mittels Western-Blot nachzuweisen und über die indirekte Immunfluoreszenz Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation des RK-MTX-2 zu erhalten (s. 4.2.3). Im Ergebnis konnte das Protein MTX-2-HA im Gegensatz zum MTX-1-HA in beiden Fällen nicht nachgewiesen werden.

Damit erwies sich entweder die Methode als nicht ausreichend sensitiv, den MTX-2 hinsichtlich der Expression und subzellulärer Lokalisation zu charakterisieren oder eine stabile Proteinexpression blieb trotz nachgewiesener stabiler RNA-Expression aus.

WITT et al. (2004) untersuchten die Halbproteine des humanen RFC vor und hinter der Schlaufe (TMD 1-6 und TMD 7-12) hinsichtlich einer eigenständigen Expression. Dabei entspricht das Halbprotein mit den TMD 1-6 strukturell annähernd der hier untersuchten Splicing-Variante MTX-2. Das Halbprotein TMD 1-6 (wie auch das Halbprotein TMD 7-12) konnte mittels Westernblot ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden, ob die Proteinvariante RK-MTX-2 exprimiert wird und ob die aktive MTX-Aufnahme des Zellklons S-5 auf das zu untersuchende Protein RK-MTX-2 zurückzuführen war.

5.2.2 Analyse der GFP-Fusionsproteine der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX- 5 und RK-MTX-6

Anhand der Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen konnte in dieser Arbeit die Proteinexpression der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt und deren subzelluläre Lokalisation in transient transfizierten Zellen bestimmt werden.

Dabei verhielten sich die Varianten sowohl in der Betrachtung einer eigenständigen Funktion unter Verwendung der Zelllinien COS-1 und MDCK (keine endogene Expression des MTX-1) als auch einer möglichen akzessorischen Funktion in der Zelllinie HPCT-1E3 (endogene Expression des MTX-1) identisch (s. 4.3.2).

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Proteine MTX-2, MTX-5 und MTX-6 im geringeren Maß als das Protein MTX-1 und das ungekoppelte GFP exprimiert wurden.

Im Gegensatz zum MTX-1 blieb die für ein Transportprotein notwendige Lokalisation in der Zellmembran aus. Stattdessen kam es über einen Zeitraum von 72 h zur Akkumulation in undefinierten subzellulären Strukturen im Zytoplasma. Über diesen Zeitraum hinaus erwies sich die Proteinexpression der Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 als nicht stabil.

5.2.2.1 Subzelluläre Lokalisation der Splicing-Varianten RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX- 5 und RK-MTX-6

Die subzelluläre Lokalisation des MTX-1 in der Zellmembran der transfizierten Zelllinien bestätigte sich in der Betrachtung des GFP-Fusionsproteins GFP-MTX-1 (s. Abb. 25). Die Membranlokalisation ist für das Protein unabdingbar, um seine funktionelle Aktivität als Transportprotein wahrnehmen zu können. Voraussetzung hierfür ist ein korrektes Protein-

Targeting, d.h. der zielgerichtete Transport des Proteins vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in sekretorischen Vesikeln zur Zelloberfläche. Die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 wurden im Gegensatz zum MTX-1 nicht zur Zellmembran transportiert. Möglicherweise fehlen den Varianten aufgrund ihrer verkürzten Struktur wichtige für das Protein-Targeting notwendige Signalpeptide bzw. Signalebereiche, die für den RFC bislang noch nicht identifiziert sind.

MARCHANT et al. (2002) untersuchten den Transport des humanen RFC (591 Aminosäuren) zur Zellmembran über die Konstruktion von unterschiedlich verkürzten GFP-Fusionsproteinen (hRFC x-y) in transient transfizierten Epithelzellen. Nach 48 Stunden war der vollständige hRFC 1-591 in Übereinstimmung mit den Untersuchungen zum MTX-Carrier-1 in die Zellmembran integriert. Die Entfernung zytoplasmatischer N- und C-terminaler Sequenzen in den Deletionskonstrukten hRFC 1-530, hRFC 1-452 und hRFC 19-466 blieb ohne Einfluss auf das korrekte Protein-Targeting.

Die Deletionskonstrukte hRFC 1-301 und hRFC 1-144 wiesen hingegen eine geringere Expressionsrate auf und verblieben in nicht näher definierten intrazellulären Strukturen. Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6, die mit dem Deletionskonstrukt hRFC 1-301 annähernd strukturell vergleichbar sind. MARCHANT et al. (2002) schlossen aus den Ergebnissen, dass die für das Protein-Targeting notwendigen Signalsequenzen nicht im zytoplasmatischen N- bzw. C-Terminus lokalisiert sind. Das Fehlen der hinteren TMD führt dagegen zum intrazellulären Verbleib der verkürzten Proteine, die gleichzeitig vermindert exprimiert werden.

Neuere Studien über das Protein-Targeting des zur gleichen Genfamilie SLC19A gehörenden humanen Thiamintranporters-2 (SLC19A3, hTHR2) korrelieren mit den oben ausgeführten Ergebnissen und führen über diese hinaus (SUBRAMIAN et al. 2006). Das Transportprotein hTHR2 weist hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem hRFC auf. Als Membranprotein verfügt es ebenfalls über 12 TMD mit zytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Termini und einer großen intrazellulären Schlaufe zwischen TMD 6 und 7. Die Aminosäuresequenz stimmt zu ca. 45% mit dem hRFC überein (GANAPATHY et al. 2004).

In der Studie wurden ebenfalls Deletionskonstrukte des Transportproteins als GFP-Fusionsproteine in transient transfizierten Epithelzellen analysiert, um Aufschluss über die Lokalisation der für das Protein-Targeting notwendigen Strukturen zu erhalten.

SUBRAMIAN et al. (2006) bestätigten für den hTHR2, dass die Verkürzung des Proteins um den zytoplasmatischen C-Terminus den Transport zur und die Integration in die Zellmembran nicht verhinderte. Diese Proteinkonstrukte wurden wie das unverkürzte THR2-GFP-

Fusionsprotein innerhalb von 48 h in der Zellmembran lokalisiert. Weitere Verkürzungen C-terminaler Sequenzen führten jedoch zu einem kompletten Verlust des Proteintransports zur Zelloberfläche. Allein die Entfernung der nur 9 letzten Aminosäuren der TMD 12 unterband das Protein-Targeting. Das Fehlen C-terminaler Transmembrandomänen nach TMD 6 führte zu einem intrazellulären Verbleib der Proteinkonstrukte. Gleichzeitig konnte einhergehend mit der Verkürzung eine deutliche Verringerung der Proteinexpression registriert werden.

Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit untersuchten Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 konnte für ein strukturell ähnliches Proteinkonstrukt des THR2 (Fehlen der TMD 7-12) eine geringere Expression, sowie eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden. Die Autoren lokalisierten den Verbleib der Proteinkonstrukte anhand weiterführender methodischer Untersuchungen im endoplasmatischen Retikulum. Das Verhalten der von den Autoren verkürzten Deletionskonstrukte wurde nur nach transienter und nicht nach stabiler Transfektion in Zelllinien untersucht.

Zwar konnten anhand der Arbeiten von MARCHANT et al. (2002) und SUBRAMIAN et al. (2006) die Sequenzen oder Strukturen, die für den Transport notwendig sind nicht identifiziert, jedoch in den TMD 7-12 lokalisiert werden.

Neben der Abwesenheit der in TMD 11 lokalisierten Substratbindungsdomäne (HOU et al. 2006) fehlen den verkürzten Protein-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 demnach die für das Protein-Targeting notwendigen Signalbereiche. Infolgedessen können sie nicht zur Zelloberfläche transportiert und in die Zellmembran integriert werden. Stattdessen akkumulieren die geringer exprimierten Proteine in subzellulären Strukturen, möglicherweise im endoplasmatischen Retikulum. In einem Zeitraum von 72 h bis 96 h nach der transienten Transfektion waren die Varianten degradiert.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass für die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 aufgrund ihrer vorausgesagten verkürzten Struktur eine funktionelle Transportaktivität ausgeschlossen werden kann.

5.2.2.2 Die Splicing-Varianten RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6 werden nicht stabil exprimiert und sind mögliche Substrate für den sog. „Nonsense Mediated Decay (NMD)“

In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die GFP-Fusionsproteine der verkürzten Proteinvarianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 im Gegensatz zum MTX-1 nicht stabil exprimiert wurden (s. 4.3.3).

In der Betrachtung der stabil mit den MTX-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 transfizierten Zelllinien war eine abnehmende Fluoreszenz der Zellen bis zum Tag 4 nach der Transfektion sichtbar. Darüber hinaus konnte nach der Selektion keine Proteinexpression der Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 mehr nachgewiesen werden. Hierbei wurde kein kontinuierlicher Prozess von Proteinexpression und Proteinabbau wie in der transienten Transfektion beobachtet, vielmehr blieb die Proteinexpression ab Tag 4 gänzlich aus. Insofern erwiesen sich in den stabilen Zelllinien nicht die Proteine als solche als instabil, sondern deren Expression musste schon durch einen vorhergehenden Prozess unterbunden worden sein.

Gleichzeitig konnten die Resultate jedoch nicht auf eine fehlende RNA-Expression zurückgeführt werden, da diese für alle MTX-Varianten noch über den Zeitraum von 14 Tagen hinaus nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 26). Demzufolge ist die Ursache für die instabile Expression der MTX-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 mit hoher Wahrscheinlichkeit einem Vorgang zwischen der RNA-Expression und der Proteinexpression zuzuordnen.

Im Gegensatz zu den artifiziellen Deletionskonstrukten in den Studien über funktionell und strukturell bedeutsame Strukturen des RFC/Rfc (s. 2.3.3 und 5.2.2.1) sind die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 nachgewiesene RNA-Varianten des MTX-Carriers. Diese werden durch den Vorgang des alternativen Spleißens generiert, bei dem Intron III und seiner Splice-Sites besondere Bedeutung zukommt. Im Fall des MTX-1 wird dieses Intron durch Nutzung seiner beiden Splice-Sites entfernt, beim MTX-2 wird dieses Intron nicht gespleißt und in den Varianten MTX-5 und MTX-6 jeweils nur eine Splice-Site genutzt bzw. nicht genutzt. Da die Mechanismen, die zur Selektion von Splice-Sites führen, noch nicht hinreichend charakterisiert sind (s. 2.4), ist diese Varianz in der Nutzung der Splice-Sites nicht ursächlich herzuleiten.

Neben der Generierung von RNA-Varianten aus einem Gen durch den Vorgang des alternativen Spleißens, verfügt die Zelle über einen Mechanismus bestimmte RNA-Transkripte über den Prozess des Nonsense Mediated Decay (NMD) abzubauen (s. 2.4)

Nicht alle Substrate, die dem NMD zugeführt werden, sind defekte RNA-Transkripte, die durch Mutationen oder Synthesefehler verursacht wurden. Daneben unterliegen auch alternativ gespleißte RNA-Varianten dem NMD. Dies betrifft insbesondere ineffektiv gespleißte Varianten, die fälschlicherweise Introns enthalten oder deren Leserahmen verschoben wurde. Hauptkriterium für den Abbau dieser RNA-Transkripte ist aber das

Vorhandensein eines vorzeitigem Stopp-Codons (PTC), welches durch den Vorgang des alternativen Spleißens generiert wurde (AMRANI et al. 2006).

Die Splicing-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 weisen infolge des alternativen Spleißens eine Intronretention (MTX-2) bzw. eine Verschiebung des Leserahmens (MTX-5, MTX-6) auf. Dies führt in allen Varianten zu einem vorzeitiges Stopp-Codon in Intron III (MTX-2) bzw. in Exon V (MTX-5, MTX-6). Nach LEWIS et al. (2003) wird ein Stopp-Codon alternativer Splicing-Varianten als Premature Termination Codon (PTC) klassifiziert, wenn es mehr als 50 Nukleotide vor der letzten Exon-Exon-Verbindung lokalisiert ist. Diese Klassifizierung trifft auf die Stopp-Codons der drei Splicing-Varianten des MTX-Carriers zu (s. 4.1.5).

Der Prozess des NMD beinhaltet, dass ein PTC in RNA-Varianten als solches erkannt wird. Die Translation ist die Voraussetzung dafür, dass eine RNA dem NMD zugeführt wird (STOILLOV et al. 2004). Nach dem Spleißen bleiben die Exon-Exon-Grenzen durch einen Proteinkomplex, den sog. „Exon junction complex (EJC)“ markiert. Dieser wird durch das Spleißosom sequenzunspezifisch 20-25 Nukleotide stromaufwärts an jeder Verknüpfungsstelle zweier Exons deponiert (LE HIR et al. 2000). Diese Proteinkomplexe werden im Normalfall während der ersten Translationsrunde entfernt. Beim Vorhandensein eines PTC mehr als 50-55 Basenpaare vor der letzten Exon-Exon-Grenze bleiben jedoch ein oder mehrere EJC erhalten und führen zur Aktivierung des NMD.

Am Ende der Transkription wird die prä-mRNA mit einer vor Exonukleasen schützenden 5'-Cap-Struktur, bestehend aus einem modifizierten Guanotin, versehen. Durch die Aktivierung des NMD während der Translation im Zytoplasma wird diese sog. „Kappe“ am 5'-Ende entfernt und anschließend erfolgt der Abbau der mRNA vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende (JACOBSON u. PELTZ 1996, MUHLRAD et al. 1994, MUHLRAD u. PARKER 1994).

Die vorzeitige Termination wird als biochemisch verschieden zu der normal verlaufenden Termination der Proteinbiosynthese beschrieben. Der genaue Mechanismus und die notwendigen Faktoren des NMD sind für Säugerzellen jedoch noch nicht vollständig erschlossen (AMRANI et al. 2006).

Die Aufgabe des NMD besteht in dem Abbau fehlerhafter RNA und bestimmter RNA-Varianten. Diese RNA-Varianten können durch fehlerhaftes Spleißen entstanden sein, möglicherweise kommt der Kopplung vom alternativen Spleißen und NMD aber auch eine große Bedeutung in der Regulation der Proteinexpression zu (LEWIS et al. 2003).

Im Fall der RNA-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 kann nicht entschieden werden, ob ihnen ein fehlerhaftes Spleißen zugrunde liegt oder ob den Varianten regulatorische Bedeutung beigemessen werden kann. Möglicherweise sind die Splice-Sites des Intron III nicht eindeutig und stellen einen Schwachpunkt in der DNA des MTX-Gens (rat slc19a1) dar. MADERAZO et al. (2003) weisen dem NMD als Hauptfunktion den Schutz der Zelle vor der Akkumulation verkürzter Proteine zu. Demnach verhindert der NMD, dass RNA-Varianten mit einem PTC in der codierenden Region endgültig in ihre möglichen verkürzten Translationsprodukte überführt werden. Die möglichen Translationsprodukte MTX-2, MTX-5 und MTX-6 wären im Vergleich zum MTX-1 gravierend verkürzte Proteinvarianten. In jedem Fall erfüllen die RNA-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 die Kriterien, die sie zu potenziellen Substraten des NMD erheben.

Aus den Vorgängen des alternativen Spleißens und des NMD lässt sich erklären, dass auf RNA-Ebene die Splicing-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 des MTX-Carriers existieren, für die jedoch keine stabile Proteinexpression nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit zu evaluieren, ob mögliche Splicing-Varianten auch wirklich als Protein-Varianten existieren. So enthielten frühere Datenbanken unter Nichtberücksichtigung des NMD Protein-Varianten, die in Zellen nicht exprimiert wurden (STAMM et al. 2005).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit wurde erstmalig das MTX-Gen (slc19a1) der Ratte identifiziert und seine genomische Struktur aufgeklärt. Gleichzeitig konnten die bekannten und neu detektierten cDNA-Varianten RL-/RK-MTX-1, RL-/RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6 als Splicing-Varianten des MTX-Carriers identifiziert werden.

Für die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 wurde ermittelt, dass ihre möglichen Translationsprodukte im Vergleich zum MTX-1 C-terminal verkürzt wären und damit wichtige Strukturen in Hinblick auf Substratbindung, Protein-Targeting und Proteinestabilität in den Varianten nicht ausgebildet werden können. Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass die möglichen Proteinvarianten weder eine Transportaktivität noch eine korrekte Lokalisation in der Zellmembran aufwiesen. Anhand der vorliegenden Arbeit konnte jedoch darüber hinaus gezeigt werden, dass die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 auf RNA-Ebene, dagegen aber nicht auf Protein-Ebene stabil exprimiert werden. Demzufolge konnte eine funktionelle Bedeutung der Splicing-Varianten als Proteinisoformen des MTX-Carriers ausgeschlossen werden.

Die Menge an mRNA ist von der Syntheserate und der Rate des Abbaus abhängig. Auf diese Weise ist eine regulatorische Funktion der Splicing-Varianten durch die Kopplung von alternativen Spleißen und NMD nicht auszuschließen. Die Resultate der RT-PCR zeigen, dass die transportaktive Variante MTX-1 die dominante RNA-Form darstellt, d.h. im Vergleich zum MTX-1 sind auf RNA-Ebene weniger Transkripte der Splicing-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 exprimiert (s. Abb.4). So ist eine Regulation des MTX-Transports über die Steuerung der Menge der Transkripte der Splicing-Varianten möglich, indem das Verhältnis der mRNA-Anteile der Splicing-Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 zu Gunsten oder zu Ungunsten des transportaktiven MTX-1 reguliert wird. Inwieweit den Splicing-Varianten diese funktionelle Bedeutung zukommt, gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen. In Hinblick auf die unterschiedlichen 5'-UTR der MTX-Varianten in Leber und Niere sowie weiterer möglicher Varianten in anderen Organen bedarf es ebenfalls weiterführender Untersuchungen. Es ist anzunehmen, dass alternative 5'-UTR gewebspezifische Bedeutung haben, in Bezug auf die Ursache und die möglichen regulatorischen Konsequenzen sind jedoch bislang wenig Daten verfügbar. Durch die Möglichkeit des alternativen Spleißens ergibt sich die immense Komplexität des Proteoms im Verhältnis zum Genom. Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen die Notwendigkeit, Splicing-Varianten umfassend sowohl auf molekularbiologischer als auch auf funktioneller Ebene zu charakterisieren. Mit der Verbindung dieser Ebenen leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur weiterführenden Charakterisierung des Transportproteins MTX-Carrier (Rfc) hinsichtlich seiner Splicing-Varianten und zur Bedeutung des alternativen Spleißens auf konkreter Ebene.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Stephanie Schrader

Molekularbiologische und zellbiologische Charakterisierung alternativer Splicing-Varianten des Methotrexat-Carriers/Rfc

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

Eingereicht im Mai 2008

108 S., 28 Abb., 1 Tab, 163 Lit., 2 Anhänge

Schlüsselworte: Methotrexat-Carrier, MTX, NMD, Rfc, slc19a1, Splicing-Varianten

Die Chemotherapie hat in letzten Jahren in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Zytostatikum Methotrexat (MTX) wird in der Veterinärmedizin vorwiegend zur Behandlung von Lymphomen und lymphatischen Leukämien eingesetzt. In der Humanmedizin findet es aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung auch bei nicht neoplastischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis Anwendung. Die Aufnahme von reduzierten Folaten und MTX wird vornehmlich als aktiver Transport über den Reduced folate carrier (Rfc) vermittelt. Inzwischen konnte die für das Transportprotein codierende cDNA aus Maus (mRfc) und Hamster (haRfc) und Mensch (hRFC) isoliert und das jeweilige Gen identifiziert werden. Ein orthologes Transportsystem für MTX (MTX-Carrier) wurde auch für die Ratte beschrieben. Die full-length cDNAs des MTX-Carriers wurden aus Leber und Niere isoliert und die Proteine funktionell charakterisiert. Während die cDNAs der MTX-Carrier aus Leber und Niere im codierenden Sequenzbereich identisch waren und für ein Protein bestehend aus 512 Aminosäuren codierten, wiesen die cDNAs im 5'-untranslatierten Bereich unterschiedliche Sequenzen auf. Aus der Leber wurde zudem eine cDNA Variante des MTX-Carriers isoliert, die sich im Sequenzvergleich mit der cDNA des MTX-Carriers durch eine Insertion von 203 bp auszeichnete und als MTX-2 bezeichnet wurde. Die Varianz ist möglicherweise auf alternatives Spleißen der Prä-mRNA zurückzuführen.

Alternatives Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus, verschiedene Proteine aus einem Gen zu generieren. Während in den letzten Jahren zwar zunehmend alternativ gespleißte Transkripte auch für den RFC entdeckt wurden, wurden nur verhältnismäßig wenige dieser Transkripte weiterführend charakterisiert. In dieser Arbeit wurden Splicing-Varianten des MTX-Carrier der Rattenniere molekularbiologisch und zellbiologisch charakterisiert. Für die Niere wurden mittels RT-PCR vier mögliche Splicing-Varianten des MTX-Carriers (RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6) identifiziert. Dabei wies die Variante MTX-2 im Vergleich zum MTX-1 eine Insertion von 203 bp auf und war in der 5'-UTR identisch mit dem renalen MTX-1. Die Varianten MTX-5 und MTX-6 wiesen eine Deletion von 119 bp und 116 bp auf. Ein Vergleich der Sequenzen dieser renalen Varianten und der bekannten Sequenzen der Varianten aus der Leber (RL-MTX-1, RL-MTX-2) mit den Daten des Rat Genome Project führte zur Identifizierung des MTX-Gens auf dem Rattenchromosom 20 (NCBI AABR01066371) sowie zur Aufklärung seiner genomischen

Organisation. Insgesamt wurden auf diese Weise 7 Exons und 6 Introns erkannt. Gleichzeitig konnten die Varianten als Splicing-Varianten des MTX-Carriers definiert werden. Die ersten beiden Exons werden alternativ in Leber und Niere genutzt, daher ist anzunehmen, dass der Prozess des alternativen Spleißens der Exons I und Ia gewebspezifisch erfolgt und wahrscheinlich regulatorisch von Bedeutung ist. Die Insertion von 203 bp des MTX-2 in Leber und Niere erklärt sich durch die Retention des Intron III. Die Varianten MTX-5 und MTX-6 entstehen durch die verkürzten alternativen Exons IIIa und IVa durch die Nutzung alternativer Splice-Sites. Während die unterschiedlichen 5'-UTR des renalen und hepatozellulären MTX-1 keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben, ergeben sich für die Varianten MTX-2, MTX-5 und MTX-6 laut Proteinvorhersage weitreichende Konsequenzen. Das alternative Spleißen führt in allen Varianten zu einem vorzeitigen Stopp-Codon in der codierenden Region und in der Folge zu C-terminal verkürzten Proteinvarianten. Während für den MTX-1 12 TMD vorausgesagt sind, codieren die cDNAs der Varianten nur noch für ein Protein mit 7 TMD (MTX-2, MTX-6) bzw. 6 TMD (MTX-5). Studien mit Deletionskonstrukten des RFC/Rfc anderer Spezies zeigten, dass in den C-terminalen TMD 7-12 bedeutsame Strukturen funktioneller und struktureller Art lokalisiert sind. Insbesondere fehlen den Varianten damit die Substratbindungsdomäne, sowie noch nicht identifizierte Strukturen oder Sequenzen, die für das Protein-Targeting zur Zellmembran erforderlich sind.

Funktionelle Untersuchungen am RK-MTX-2 zu einer Aufnahmeaktivität von MTX in stabil transfizierten MDCK führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Während die mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und Westernblot keine Proteinexpression des RK-MTX-2 ermittelt. Die Proteinexpression der Splicing-Varianten MTX-1, MTX-2, MTX-5 und MTX-6 konnte jedoch anhand von GFP-Fusionsproteinen in transienter Transfektion in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt und die subzelluläre Lokalisation der Proteine bestimmt werden. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Proteine MTX-2, MTX-5 und MTX-6 geringer als MTX-1 und das ungekoppelte GFP exprimiert wurden. Im Gegensatz zum MTX-1 blieb die für ein Transportprotein notwendige Lokalisation in der Zellmembran aus. Stattdessen kam es über einen Zeitraum von 72 h zur Akkumulation in subzellulären Strukturen im Zytoplasma, möglicherweise dem endoplasmatischen Retikulum.

Es ist anzunehmen, dass den Varianten aufgrund ihrer verkürzten Proteinstruktur die notwendigen Strukturen für das Protein-Targeting fehlen und sie somit nicht korrekt zur Zellmembran transportiert und folglich abgebaut werden. Nach stabiler Transfektion war im Gegensatz zum GFP und GFP-MTX-1 keine Proteinexpression nachweisbar. Die RNA hingegen wurde bei allen Varianten stabil exprimiert. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass den Varianten als mögliche Proteinisoformen des MTX-Carriers zumindest *in vitro* keine funktionelle Bedeutung zugesprochen werden kann. Durch die vorzeitigen Stopp-Codons (PTC) in den Varianten, die durch das alternative Spleißen entstehen, sind sie als mögliche Substrate für den „Nonsense Mediated Decay“ (NMD) klassifiziert. Der NMD dient einerseits dem Abbau fehlerhafter und fehlgespleißter mRNA. Möglicherweise sind die Splice-Sites des Intron III nicht eindeutig und stellen einen Schwachpunkt der DNA des MTX-Gens (rat slc19a1) dar. Andererseits könnte die Kopplung vom alternativen Spleißen und NMD auch eine große Bedeutung in der Regulation der Proteinexpression einnehmen. In Bezug auf den MTX-Carrier könnte der MTX-Transport über die Steuerung der Menge der Transkripte der Splicing-Varianten reguliert sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die Notwendigkeit einer sowohl molekularbiologischen als auch funktionellen Untersuchung möglicher alternativer Splicing-Varianten.

7 SUMMARY

Stephanie Schrader

Molecularbiological and cellbiological characterization of alternative splicing variants of methotrexate-carrier/Rfc

Institute of Pharmacology, Pharmacy und Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Submitted in May 2008

108 pages, 28 figures, 1 table, 163 references, 2 appendices

Keywords: Methotrexate-carrier, MTX, NMD, Rfc, slc19a1, splicing variants

During the last years chemotherapy became increased importance in veterinary medicine. In this way, the chemotherapeutic drug methotrexate (MTX, Amethopterin) is widely used in the treatment of lymphomas and lymphocytic leukemia. Because of immune-suppressive effects of MTX it is also used to treat non-neoplastic diseases in human medicine, such as rheumatoid arthritis. Cellular uptake of reduced folates and the antifolate MTX mainly is mediated by the reduced folate carrier (Rfc1; Slc19a1).

Meanwhile the corresponding cDNA coding for the reduced folate carrier protein has been isolated from mouse (mRfc), hamster (haRfc) and human (hRFC) and the corresponding gene was identified. The MTX-carrier represents the rat ortholog. The full length cDNAs of MTX-carrier from liver and kidney was found to be identical in the coding region according to a protein consisting of 512 amino-acids, but the cDNAs differed in their 5'-untranslated region. Furthermore, a cDNA variant of MTX-carrier was isolated from rat liver (MTX-2) characterized by an insertion of 203 bp. MTX-2 could be generated by alternative splicing of pre-mRNA. Alternative splicing is an important mechanism to generate different mRNA and protein isoforms from a single gene. During the last years a huge of alternative splicing variants were observed also for RFC but only few of them were characterized successfully. In this study splicing variants of MTX-carrier of rat kidney were characterized with molecular and cell biology methods.

Four putative splicing variants of MTX-carrier of rat kidney have been identified by RT-PCR: RK-MTX-1, RK-MTX-2, RK-MTX-5 und RK-MTX-6. Compared to MTX-1, MTX-2 is characterized by an insertion of 203 bp and was identical to renal MTX-1 in the 5'-UTR. Sequencing of MTX-5 and MTX-6 revealed two variants that differed from MTX-1 by deletion of 116 and 119 bp, respectively. Homology searches of the rat genome database revealed a locus on rat chromosome 20 containing all sequences of the full length MTX-cDNA clones and fragments thereof that were isolated from rat tissue so far (NCBI AABR01066371). The genomic organization of rat slc19a1 was characterized, and simultaneously the variants has been defined as splicing variants of MTX-carrier.

An alignment suggested the existence of seven exons and six introns. All splice donor and acceptor site sequences were in agreement with the consensus GT/AG with exception of the third intron. The alternative use of the first exon I and Ia in liver and kidney indicates a tissue-specific alternative

splicing and its regulatory importance. Such 5'-heterogeneity may be the consequences of tissue specific promoters. The insertion of 203 bp of MTX-2 in liver and kidney can be explained by retention of intron III. The variants MTX-5 and MTX-6 were generated by usage of alternative splice sites with shortened alternative Exons IIIa and IVa. The different 5'-UTR of RL-MTX and RK-MTX has no effect on the predicted protein structure, but alternative splicing resulted in considerable variations of the putative products of MTX-2, MTX-5 and MTX-6. For this variants, alternative splicing resulted in a premature termination codon (PTC) in the coding region causing C-terminal shortened protein variants. 12 TMD are postulated for MTX-1, but the cDNA of the variants are translated to a protein with 7 TMD (MTX-2, MTX-6) and 6 TMD (MTX-5), respectively. In earlier studies, deletion mutagenesis has been used to assess the structural determinants for membrane targeting and transport activity by RFC/Rfc. The results indicate an important role of the C-terminal TMD 7-12. Thus, a substrate binding domain was localized within TMD 11. In consequence, important structures for transport and non-identified C-terminal sequences, which appear an absolute requirement for membrane targeting are lacking in the variants MTX-2, MTX-5 and MTX-6.

Transport activity of MTX-2 in stable transfected MDCK cells was measured as uptake of ^3H -MTX, but showed no significant results. Investigation of gene expression of MTX-2 in stable transfected MDCK cells by RT-PCR indicates an expression of mRNA by RT-PCR, whereas protein expression of RK-MTX-2 could not be detected by immunohistochemistry and Westernblot analysis.

Fusion proteins of MTX-1, MTX-2, MTX-5 and MTX-6 with green fluorescent protein (GFP) were designed to image protein expression in transfected MDCK, COS-1 and HPCT cells.

GFP and GFP-MTX-1 protein were strongly expressed with comparable efficiency. In contrast, GFP fusions protein of MTX-2, MTX-5 and MTX-6, were expressed less efficiently. Major differences were also observed in the subcellular localization of the expressed proteins. In contrast to MTX-1, no localization in the cell-membrane could be proved. GFP-MTX-2, GFP-MTX-5 and GFP-MTX-6 were evenly distributed throughout the cytoplasm of the cell and during a period of 72 h accumulation in unidentified structures of cytoplasm, possibly in the endoplasmatic reticulum, was observed.

The truncation of the amino acid sequence may affect not only the function and trafficking to the cell surface, but also the rates of synthesis and degradation of the truncated protein variants.

COS-1 and MDCK cells were stably transfected and analysed for mRNA expression of all MTX variants. In contrast to GFP and GFP-MTX-1, no fluorescence was detectable after 4 days of stable transfection with GFP-MTX-2, -MTX-5 and -MTX-6. However, stable expression of mRNA of all variants was observed. The results show that the variants *in vitro* have no functional importance as putative protein isoforms of MTX-carrier.

In contrast to the truncated constructs characterized by other research groups the variants MTX-2, MTX-5 and MTX-6 are generated by the cell by alternative splicing. These transcripts are apparent targets for „Nonsense Mediated Decay“ (NMD) determined by their PTC. On one hand, the NMD degrades defective or inefficiently spliced mRNA. Possibly the splice-sites of intron III are non-definite representing weak points of DNA of rat *slc19a1*. On the other hand, a regulatory role of the process in gene expression through the coupling of alternative splicing and NMD is discussed. In this way, regulation of MTX-transport by regulating the amount of transcripts of the splicing variants seems to be possible.

This study documented the importance of molecular and functional investigations of putative variants of alternative splicing and the necessity of extensive further studies in this field. The results enhance further characterization of the Rfc/MTX-carrier and elucidate the importance of alternative splicing.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allegra CJ, Boarman D. Interaction of methotrexate polyglutamates and dihydrofolate during leucovorin rescue in a human breast cancer cell line (MCF-7). *Cancer Res.* 1990; 50:3574-8.
2. Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:415-25.
3. Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1587:164-73.
4. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74:3171-75.
5. Bertino JR, Göker E, Gorlick R, Li WW, Banerjee D. Resistance mechanism to methotrexate in tumors. *Stem Cells.* 1996; 14:5-9.
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7:1513-23.
7. Bracco L, Kearsey J. The relevance of alternative RNA splicing to pharmacogenomics. *Trends Biotechnol.* 2003; 21:346-53.
8. Bremnes RM, Slordal L, Wist E, Aarbakke J. Dose-dependent pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in the rat in vivo. *Cancer Res.* 1989; 49:6359-64.
9. Brigle KE, Spinella MJ, Sierra EE, Goldman ID. Characterization of a mutation in the reduced folate carrier in a transport defective L1210 murine leukaemia cell line. *J Biol Chem.* 1995; 270:22974-79.
10. Brigle KE, Spinella MJ, Sierra EE, Goldman ID. Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1353:191-98.
11. Brigle KE, Spinella MJ, Westin EH, Goldman ID. Increased expression and characterization of two distinct folate-binding proteins in murine erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47:337-45.

12. Burger C, Wick M, Brusselbach S, Mueller R. Differential induction of “metabolic genes” after mitogen stimulation and during cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1994; 107:241-52.
13. Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:4364-75.
14. Cao W, Matherly LH. Analysis of the membrane topology for transmembrane domains 7-12 of the human reduced folate carrier by scanning cysteine accessibility methods. *Biochem J.* 2004; 378:201-06.
15. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest.* 1985; 76:907-12.
16. Chan FPH, Williams FMR, Rogers KA, Flintoff WF. Chromosomal localization of the reduced folate transporter gene (SLC19A1) in Chinese hamster ovary cells. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71:148-50.
17. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002; 62:3144-50.
18. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.* 1977; 12:1-8.
19. Clark F, Thanaraj TA. Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. *Hum Mol Genet.* 2002; 11:451-64.
20. Cotter SM, Parker LM. High-dose methotrexate and leucovorin rescue in dogs with osteogenic sarcoma. *Am J VetRes.* 1978; 39:1943-5.
21. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:163-72.
22. Dano, K. (1973): Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Acta.* 1973; 323:466-83.

23. Delepine N, Delepine G, Cornille H, Brion F, Arnaud P, Desbois JC. Dose escalation with pharmacokinetics monitoring in methotrexate chemotherapy of osteosarcoma. *Anticancer Res.* 1995; 15:489-94.
24. Dixon KH, Lanpher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem.* 1994; 269:17-20.
25. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:4008.
26. Donehower RC, Hande KR, Drake JC. Presence of 2,4-diamino-N¹⁰-methylpteroic acid after high-dose methotrexate. *Clin Pharmacol Ther.* 1979; 26:63-72.
27. Drori S, Jansen G, Mauritz R, Peters GJ, Assaraf YG. Clustering of mutations in the first transmembrane domain of the human reduced folate carrier in GW1843U89-resistant leukaemia cells with impaired antifolate transport and augmented folate uptake. *J Biol Chem.* 2000a; 275:30855-63.
28. Drori S, Sprecher H, Shemer G, Jansen G, Goldman ID, Assaraf YG. Characterization of a human alternatively spliced truncated reduced folate carrier increasing folate accumulation in parental leukaemia cells. *Eur J Biochem.* 2000b; 267:690-702.
29. Ettinger, SN. Principles of treatment of canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 18:92-97.
30. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003; 17:419-37.
31. Ferguson PI, Flintoff WF. Topological and functional analysis of the human reduced folate carrier by hemagglutinin epitope insertion. *J Biol Chem.* 1999; 274:16269-78.
32. Flatley RM, Payton SG, Taub JW, Matherley LH. Primary acute lymphoblastic leukaemia cells use a novel promoter and 5' non-coding exon for the human reduced folate carrier that encodes a modified carrier translated from an upstream translational start. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5111-22.

33. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85:8998-9002.
34. Galivan J, Johnson T, Rhee M, McGuire JJ, Priest D, Kesavan V. The role of folylpolyglutamate synthetase and gammaglutamylhydrolase in altering cellular folyl- and antifolylpolyglutamates. *Advan Enzyme Regul*. 1987; 26:147-55.
35. Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2004; 447:641-46.
36. Gilbert W. Why genes in pieces? *Nature*. 1978; 271:501.
37. Goker E, Lin JT, Trippett T, Elisseyeff Y, Tong WP, Niedzwiecki D, et al. Decreased polyglutamylation of methotrexate in acute lymphoblastic blasts in adults compared to children with this disease. *Leukemia*. 1993; 7:1000-04.
38. Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem*. 1968; 243:5007-17.
39. Goldman ID, Matherly LH. The cellular pharmacology of methotrexate. In: Goldman ID, editor. *Membrane Transport of Antineoplastic Agents*. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Oxford, UK: Pergamon; 1986. p. 283-308.
40. Gong M, Cowan KH, Gudas J, Moscow JA. Isolation and characterization of genomic sequences involved in the regulation of the human reduced folate carrier gene (RFC1). *Gene*. 1999; 233:21-31.
41. Gorlick R, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, Flintoff WF, et al. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukaemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood*. 1997; 89:1013-18.
42. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 2001; 17:99-108.
43. Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Endogenous expression of liver-specific drug transporters for organic anions in the rat hepatocytoma fusion cell line HPCT-1E3. *Eur J Cell Biol*. 2005; 84:677-86.

44. Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Downregulation of the reduced folate carrier transport activity by phenobarbital-type cytochrome P450 inducers and protein kinase C activators. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768:1671-19.
45. Hirschberger J, Dorsch R, Kaspar A, Link M, Meuser C, Neuerer F. Nebenwirkungen der Chemotherapie beim Hund. Mehrkomponenten-Chemotherapie des kaninen malignen Lymphoms. *Tierärztl Prax*. 2000; 28:164-69.
46. Hofman Y, Wirth B. hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta 1. *Hum Mol Genet*. 2002; 11:2037-49.
47. Hofmann K, Stoffel W. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem*. 1993; 374:166.
48. Honscha W, Dötsch KU, Thomsen N, Petzinger E. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology*. 2000; 31:1296-1304.
49. Honscha W, Petzinger E. Characterization of the bile acid sensitive methotrexate carrier of rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999; 359:411-19.
50. Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res*. 1999; 59:2532-35.
51. Horne DW. Na⁺ and pH dependence of 5-methyltetrahydrofolic acid and methotrexate transport in freshly isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1990; 1023:47-55.
52. Hou Z, Staples SE, Haska CL, Matherly LH. Localization of a substrate binding domain of the human folate carrier to transmembrane domain 11 by radioaffinity labelling and cysteine-substituted accessibility methods. *J Biol Chem*. 2005; 36206-13.
53. Hou Z, Ye J, Haska CL, Matherly LH. Transmembrane domains 4, 5, 7, 8 and 10 of the human reduced folate carrier are important structural or functional components of the transmembrane channel for folate substrates. *J Biol Chem*. 2006; 281:33588-96.
54. Jacobson A, Peltz SW. Interrelationships of the pathway of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:693-739.

55. Jansen G. Receptor and carrier-mediated transport systems for folates and antifolates: Exploitation for folate based chemotherapy and immunotherapy. In: Jackman AL, editor. Antifolate drugs in cancer therapy. NJ: Humana Press, 1999; p. 293-321.
56. Josting A, Diehl V, Engert A. Methotrexat: Pharmakologie, Toxizität und Rescuemaßnahmen bei hochdosierter Behandlung. *Der Onkologe*. 1998; 4:974-85.
57. Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*. 2003; 12:5-14.
58. Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. *Semin Oncol*. 1997; 24:30-39.
59. Kamen BA, Wang MT, Streckfuss AJ, Peryea X, Anderson RGW. Delivery of folates to cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. *J Biol Chem*. 1988; 263:13602-09.
60. Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res*. 2001; 11:889-900.
61. Kan Z, States D, Gish W. Selecting for functional alternative splices in ESTs. *Genome Res*. 2002; 12:1837-45.
62. Kessler M. Prinzipien der Chemotherapie. In: Kessler M, editor. Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Berlin: Parey; 2005. p. 113-19.
63. Kinoshita A, Kurosawa Y, Kondoh K, Suzuki T, Manabe A, Inukai T et al. Effects of sodium in hydration solution on plasma methotrexate concentrations following high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003; 51:256-60.
64. Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Sodium-dependant methotrexate carrier-1 is expressed in rat kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 566:564-71.
65. Kneuer C, Honscha W. The H⁺-dependent reduced folate carrier 1 (RFC1) of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 of the rat are orthologs. *FEBS Lett*. 2004; 566:83-6.

66. Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Rat reduced-folate carrier-1 is localized basolaterally in MDCK kidney epithelial cells and contributes to the secretory transport of methotrexate and fluoresceinated methotrexate. *Cell Tissue Res.* 2005; 320:517-24.
67. Kremer JM, Petrillo GF, Hamilton RA. Pharmacokinetics and renal function in patients with rheumatoid arthritis receiving a standard dose of oral weekly methotrexate: association with significant decreases in creatinine clearance and renal clearance of the drug after 6 months of therapy. *J Rheumatol.* 1995; 22:38-40.
68. Kroker R. Zytostatika. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R. *Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren.* Berlin: Parey 1997; p. 295-97.
69. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982; 157:105-32.
70. Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J.* 2001; 20:4987-97.
71. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated decay in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100:189-92.
72. Link M, Hirschberger J. Maligne Lymphome und lymphatische Leukämien. Eine Literaturübersicht. Teil 1: Therapie in der Veterinärmedizin (Hund und Katze) und Humanmedizin. *Tierärztl Prax.* 1999; 27:29-38.
73. Liu M, Whetstone JR, Payton SG, Ge Y, Flatley RM, Matherly LH. Roles of USF, Ikaros, and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promotor. *Biochem J.* 2004; 383:249-57.
74. Liu M, Ge Y, Cabelof DC, Aboukameel A, Heydari AR, Mohammad R et al. Structure and regulation of the murine reduced folate carrier gene: Identification of 4 non-coding exons and promoters and regulation by dietary folates. *J Biol Chem.* 2005; 280:5588-97.
75. Liu X, Matherly L. Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1564:333-42.

76. Liu XY, Matherly LH. Functional interaction between arginine-133 and aspartate-88 in the human reduced folate carrier: Evidence for a charge-pair association. *Biochem J.* 2001; 358:511-16.
77. Liu XY, Witt TL, Matherly LH. Restoration of high level transport activity by human reduced folate carrier/ThTr1 chimeric transporters: Role of the transmembrane domain 6/7 linker region in reduced folate carrier function. *Biochem J.* 2003; 369:31-37.
78. Lopez AJ. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet.* 1998; 32:279-305.
79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.
80. Losson R, Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76: 5134-37.
81. Luhrs CA. The role of glycosylation in the biosynthesis and acquisition of ligand-binding activity of the folate-binding protein in KB cells. *Blood.* 1991; 77:1171-80.
82. MacEwen EG, Hayes AA, Matus RE, Kurzman I. Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *J Am Vet Med Assoc.* 1987; 190:564-8.
83. Madewell BR. Diagnosis, assessment of prognosis, and treatment of dogs with lymphoma: the sentinel changes (1973-1999). *J Vet Intern Med.* 1999; 13:393-94.
84. Maderazo AB, Belk JP, He F, Jacobson A. Nonsense containing mRNAs that accumulate in the absence of a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway are destabilized rapidly upon its restitution. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:842-51.
85. Malik R, Gabor LJ, Foster SF, McCorkell BE, Canfield PJ. Therapy for Australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J.* 2001; 79:808-17.
86. Maquat LE. Nonsense mediated mRNA decay. *Curr Biol.* 2002; 12:196-97.
87. Marchant JS, Subramanian VS, Parker I, Said HM. Intracellular trafficking and membrane targeting mechanisms of the human reduced folate carrier in mammalian epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277:33325-33.

88. Matherly LH, Goldman ID. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003; 66:403-56.
89. Matherly LH, Voss MK, Anderson LA, Fry DW, Goldman ID. Enhanced polyglutamylation of aminopterin relative to methotrexate in the Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 1985; 45:1073-78.
90. McKendrick L. What's new in translation initiation? The first translation determines the fate of mRNA. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:639-47.
91. Michael IP, Kurlender L, Memari N, Yousef GM, Du D, Grass L et al. Intron retention : a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem.* 2005; 51:506-15.
92. Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res.* 1999; 9:1288-93.
93. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:2850-59.
94. Moscow JA, Gong M, He R, Sgagrias MK, Dixon KH, Anzick SL, et al. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55:3790-94.
95. Muhlrads D, Decker C, Parker R. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 1994; 8:855-66.
96. Muhlrads D, Parker R. Premature translation termination triggers mRNA decapping. *Nature* 1994; 370:578-81.
97. Murray RC, Williams FM, Flintoff WF. Structural organization of the reduced folate carrier gene in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:19174-79.
98. Mutschler E. Therapeutische Maßnahmen bei malignen Tumoren. In: Mutschler E, editor. *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH; 1997. p. 742-46.

99. Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *Plant J.* 2004; 39:877-85.
100. Nilsen TW. Spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays.* 2003; 25:1147-49.
101. Norris MD, de Graaf D, Haber M, Kavallaris M, Madafiglio J, Gilbert J, et al. Involvement of MDR1 p-glycoprotein in multifactorial resistance of methotrexate. *Int J Cancer.* 1996; 65:613-19.
102. Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature.* 2002; 420:563-73.
103. Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55:1119-50.
104. Payton SG, Liu M, Ge Y, Matherly LH. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier A1/A2 promoter: Identification of critical roles for the USF and GATA families of transcription factors. *Biochim Biophys Acta.* 2005a; 1731:115-24.
105. Payton SG, Whetstone JR, Ge Y, Matherly LH. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier promoter C: Synergistic transactivation by SP1 and C/EBP beta and identification of a downstream repressor. *Biochim Biophys Acta.* 2005b; 1727:45-57. Poser RG, Sirotak FM, Chello PL. Different synthesis of methotrexate polyglutamates in normal proliferative and neoplastic mouse tissue in vivo. *Cancer Res.* 1981; 41:4441-46.
106. Rajgopal A, Sierra EE, Zhao R, Goldman ID. Expression of the reduced folate carrier SLC19A1 in IEC-6 cells results in two distinct transport activities. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281:1579-86.
107. Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques.* 1996; 20:102-10.
108. Rhee MS, Wang Y, Nair MG, Galivan J. Acquisition of resistance to antifolates caused by an enhanced gamma-glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res.* 1993; 53:2227-30.

109. Riley JH, Riley MG. Metastatic mammary carcinoma treated with cytotoxic drugs. *Vet Rec.* 1982; 111:8-11.
110. Rogers KS. Transmissible venereal tumor. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 1997; 19:1036-45.
111. Rosenthal RC. Chemotherapy. In: Slatter DH, editor. *Textbook of small animal surgery*. Philadelphia: Saunders; 1985. p. 2405-17.
112. Rothberg KG, Ying Y, Kolhouse JF, Kamen BA, Andersen RGW. The glycopospholipid-linked folate receptor internalises folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol.* 1990; 110:637-49.
113. Roy K, Chiao JH, Spengler BA, Tolner B, Yang CH, Biedler JL et al. Chromosomal localization of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter and its amplification in an antifolate resistant variant overproducing the transporter. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 105:29-38.
114. Ruslander D. Chemotherapie. Medikamente, Dosierungen, Behandlungsprotokolle. In: Kessler M, editor. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*. Berlin: Parey; 2005. p. 119-34.
115. Sadlish H, Williams FM, Flintoff WF. Cytoplasmic domains of the reduced folate carrier are essential for trafficking, but not function. *J Biol Chem.* 2002; 364:777-86.
116. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230:1350-54.
117. Sambrook J. Adenovirus amazes at cold spring harbor. *Nature.* 1977; 268:101-04.
118. Schilling LJ, Farnham PJ. Inappropriate transcription from the 5' end of the murine dihydrofolate reductase gene masks transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:3061-68.
119. Schneider R. Epidemiologic studies of cancer in man and animals sharing the same environment. *Proc. 3rd Int. Symposium of the detection and prevention of cancer*. New York 1976; 1377-1387.

120. Seeger DR, Cosulich DB, Smith JM, Hultquist ME. Analogs of pteroyl glutamic acid. III. 4-Amino derivatives. *J Am Chem.* 1949; 71:1753-55.
121. Sharina IG, Zhao R, Wang Y, Babani S, Goldman ID. Mutational analysis of the functional role of conserved arginine and lysine residues in transmembrane domains of the murine reduced folate carrier. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:1022-28.
122. Sharina IG, Zhao R, Wang Y, Babani S, Goldman ID. Role of the C-terminus and the long cytoplasmic loop in reduced folate carrier expression and function. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63:1717-24.
123. Sharp PA. Split genes and RNA splicing. *Cell.* 1994; 77:805-15.
124. Shen F, Ross JF, Wang X, Ratnam M. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type β in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry.* 1994; 33:1209-15.
125. Shen F, Wu M, Ross JF, Miller D, Ratnam M. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: Protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry.* 1995; 33:1209-15.
126. Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ, Goldman ID. Comparison of transport properties of the reduced folate carrier and folate receptor in murine L1210 leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:1287-94.
127. Sierra EE, Goldman ID. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin Oncol.* 1999; 26:11-23.
128. Sirotnak FM, Kurita S, Hutchison DJ. On the nature of a transport alteration determining resistance to Amethopterin in the L1210 leukemia. *Cancer Res.* 1968; 28:75-80.
129. Smeland E, Fuskevaq OM, Nymann K, Svendsen JS, Olsen R, Lindal S et al. High-dose 7-hydromethotrexate: acute toxicity and lethality in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996; 37:415-22.
130. Smith CW, Valcarel J. Alternative pre-mRNA splicing. The logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:381-88.

131. Spencer HT, Sorrentino BP, Pui CH, Chunduru SK, Sleep SE, Blakley RL. Mutations in the gene for human dihydrofolate reductase: an unlikely cause of clinical relapse in pediatric leukaemia after therapy with methotrexate. *Leukemia*. 1996; 10:439-46.
132. Stamp L, Roberts R, Kennedy M, Barclay M, O'donnell J, Chapman P. The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis-are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? *Biomed Pharmacother*. 2006; 60:678-687.
133. Steward J, Gordon NT. Multi-drug resistance genes in the management of neoplastic disease. *J Vet Intern Med*. 1991; 5:239-47.
134. Stoilov P, Daoud R, Nayler O, Stamm S. Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet*. 2004; 13:509-24.
135. Subramian VS, Marchant JS, Said HM. Targeting and trafficking of the human thiamine transporter-2 in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2006; 8:5233-45.
136. Takeda M, Babu E, Narikawa S, Endou H. Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol*. 2002; 438 :137-42.
137. Tarn WY, Steitz JA. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell*. 1996; 84:801-11.
138. Teske E. Hämatopoietische Tumoren. In: Kessler M, editor. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*. Berlin: Parey; 2005. p. 477-506.
139. Tolner B, Roy K, Sirotnak FM. Organization, structure and alternate splicing of murine RFC-1 gene encoding a folate transporter. *Gene*. 1997; 189:1-7.
140. Tolner B, Roy K, Sirotnak FM. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene*. 1998; 211:331-41.
141. Tolner B, Singh A, Esaki T, Roy K, Sirotnak FM. Transcription of the mouse RFC-1 gene encoding a folate transporter. Multiplicity and properties of promoters with minimum requirements for their basal activity. *Gene*. 1999; 231:163-72.

142. Tripett TM, Garcia S, Manova K, Mody R, Cohen-Gould L, Flintoff W et al. Localization of a human reduced folate carrier protein in the mitochondrial as well as the cell membrane of leukaemia cells. *Cancer Res.* 2001; 61:1941-47.
143. Van der Wilt CL, Braakhuis BJM, Pinedo HM, De Jong M, Smid K, Peters GJ. Addition of leucovorin in modulation of 5-fluorouracil with methotrexate: Potentiating or reversing effect? *Int J Cancer.* 1995; 61:672-78.
144. Voet D, Voet JG. Antifolate sind Mittel gegen Krebs. In: Maelicke A, Müller-Esterl W, editor. *Biochemie.* Weinheim: VCH 1992; p. 760-61.
145. Von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.* 1992; 225:487-94.
146. Wang Y, Zhao R, Russel RG, Goldman ID. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1513:49-54.
147. Westerhof GR, Schornagel JH, Kathmann I, Jackman AL, Rosowsky A, Forsch RA, et al. Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity. *Mol Pharmacol.* 1995; 48:459-71.
148. Whetstine JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: Identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002a; 367:629-40.
149. Whetstine JR, Matherly LH. The basal promoters for the human reduced folate carrier gene are regulated by a GC-box and a CAMP-response element/ AP-1-like element. *J Biol Chem.* 2001; 276:6350-58.
150. Whetstine JR, Witt TL, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and Sp1 transcription factor families and a functional 61 base pair polymorphism. *J Biol Chem.* 2002b; 277:43873:80.
151. Williams FM, Flintoff WF. Structural organization of the human reduced folate carrier gene: Evidence for 5' heterogeneity in lymphoblast mRNA. *Somat Cell Mol Genet.* 1998; 24:143-56.

152. Williams FM, Murray RC, Underhill TM, Flintoff WF. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem.* 1994; 269:5810-16.
153. Withrow SJ. Why worry about cancer in pet animals. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small Animal Clinical Oncology.* Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 1-3.
154. Witt TL, Matherly LH. Identification of lysine-411 in the human reduced folate carrier as an important determinant of substrate selectivity and carrier function by systematic site directed mutagenesis. *Biochem Biophys Acta.* 2002; 1567:56-62.
155. Witt TL, Staples S, Matherly LH. Restoration of transport activity by co-expression of human reduced folate carrier half molecules in transport impaired K562 cells: Localization of a substrate binding domain to transmembrane domains 7-12. *J Biol Chem.* 2004; 279:46755-63.
156. Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1995; 270:17468-75.
157. Wong SC, Zhang L, Proefke SA, Matherly LH. Effects of the lost of capacity for N-glycosylation on the transport activity and cellular localization of the human reduced folate carrier. *Biochem Biophys Acta.* 1998; 1375:6-12.
158. Wong SC, Zhang L, Witt TL, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Impaired membrane transport in methotrexate-resistant CCRF-CEM cells involves early translation termination and increased turnover of a mutant reduced folate carrier. *J Biol Chem.* 1999; 274:10388-94.
159. Wu Q, Krainer AR. AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conversation of minor Introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:3225-36.
160. Yang R, Sowers R, Mazza B, Healey JH, Huvos A, Grier H, et al. Sequence alterations in the reduced folate carrier are observed in osteosarkoma tumor samples. *Clin Cencer Res.* 2003 ; 9:837-44.
161. Zhang L, Wong SC, Matherly LH. Transcript heterogeneity of the human reduced folate carrier results from the use of multiple promoters and variable splicing of alternative upstream exons. *Biochem J.* 1998; 332:773-80.

162. Zhao R, Gao F, Goldman ID. Discrimination among reduced folates and methotrexate as transport substrates by a phenylalanine substitution for serine within the predicted eighth transmembrane domain of the reduced folate carrier. *Biochem Pharmacol.* 1999a; 58:1615-24.
163. Zhao R, Sharina IG, Goldman ID. Pattern of mutations that result in loss of reduced folate carrier function under antifolate selective pressure augmented by chemical mutagenesis. *Mol Pharmacol.* 1999b; 56:68-76.

9 ANHÄNGE

FULL LENGTH RESEARCH PAPER

Alternative transcripts of rat *slc19a1*: Cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing

CARSTEN KNEUER, STEPHANIE SCHRADER, & WALTHER HONSCHA

*Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, An den Tierkliniken 15, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany**(Received 6 September 2004)***Abstract**

Recently, the rat genome project revealed the genomic sequence of *slc19a1*, coding for the methotrexate carrier-1, identical to the reduced folate carrier-1 of humans, on rat chromosome 20. At the same time, we have cloned and analysed the complete or partial cDNAs of now at least six different transcripts from rat liver and kidneys. Alignment with the genomic sequence revealed seven exons. The first two non-coding exons, exon I and Ia were used alternatively in kidneys and liver, respectively, suggesting usage of alternative promoters. Three minor mRNA forms resulted from absent splicing of intron III, a shortened exon III (exon IIIa), and a shortened exon IV (exon IVa). The minor transcripts were predicted to result in translation products with 7 or 6 instead of 12 transmembrane domains (TMDs) and a peptide mass of 38, 39 and 40 kDa instead of 58 kDa.

Keywords: *Gene structure, methotrexate carrier, reduced folate carrier, rfc, slc19a1, splicing variants*

Uptake of reduced folates including tetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate by mammalian tissues has been linked to a reduced folate carrier system many years ago (Goldman et al. 1968). Later, an involvement of this carrier system into uptake of hydrophilic antifolates like methotrexate and the development of antifolate resistance in tumour therapy was shown (Gorlick et al. 1997). Finally, the corresponding cDNA coding for a reduced folate carrier protein (RFC1) could be isolated from mouse and hamster (Dixon et al. 1994, Williams et al. 1994). Using this sequence as probe, the human homologue (hRFC1) was isolated from a cDNA library (Moscow et al. 1995, Wong et al. 1995). In rat, a similar carrier system with sensitivity to reduced folates was cloned and functionally characterised from liver and kidney (Honscha et al. 2000, Kneuer et al. 2004). Although a distinction was originally made between this sodium-dependent methotrexate carrier-1 (MTX-1) and

RFC1, their orthology has now been recognised (Kneuer and Honscha 2004). According to the agreed nomenclature of transport proteins, RFC1 and MTX-1 have been classified as Slc19a1: solute carrier family 19, subfamily A, member 1 (Ganapathy et al. 2004).

Many structural details of the mouse, hamster and human *rfc1* genes have been clarified in recent years. In mouse, it was localised to chromosome 10 (Roy et al. 1998) and consists of eight exons with exons I and Ia, as well as V and Va being used alternatively (Tolner et al. 1997). In addition, a truncated exon IIIa was observed, resulting in a total of four mRNA variants (Tolner et al. 1997). Alternative usage of exons I and Ia, resulting in variants 1 and 4, was later accredited to usage of tissue-specific promoters (Tolner et al. 1999). Analysis of the *rfc1* gene in hamster did reveal a similar structure with seven exons and the first two exons being short and non-coding. Two mRNA splice variants were reported that

Correspondence: W. Honscha, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, An den Tierkliniken 15, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany. Tel: 49 341 9738132. Fax: 49 341 9738149. E-mail: honscha@vetmed.uni-leipzig.de

contained either all seven exons, or had the second exon spliced out (Murray et al. 1996). There was also considerable 5'-heterogeneity in the *slc19a1* transcripts in humans, with a total of four alternative first exons (Williams and Flintoff 1998). Originally, five additional coding exons were identified (Williams and Flintoff 1998), although it was further suggested that exon six may contain an intron that is spliced in some mRNA variants (Tolner et al. 1998).

Interestingly, the MTX-1 cDNA from rat liver and kidney also differed in the 5'-untranslated region, but was identical in the coding region — suggesting usage of alternative promoters (Kneuer et al. 2004). Furthermore, a second cDNA (MTX-2) that contained an insert of 203 bp was isolated from rat liver (Honscha et al. 2000). To resolve the origin of these and other potential but yet unreported variants of the methotrexate carrier, we analysed the genomic sequence which has recently become available in course of the rat genome project and compared it to this of other species. In addition, RT-PCR fragments of five other potential mRNAs were cloned from kidney and analysed.

mRNA variants

In previous work, two mRNA variants of the rat methotrexate carrier could be identified in the liver (variants 1 and 2, (Honscha et al. 2000)) and one full length cDNA clone was obtained from kidney (variant 3, (Kneuer et al. 2004)). The transcripts from liver and kidney differed only in the 5'-non-coding region, while the second variant from liver contained an insertion within the coding region. As northern blotting revealed the highest level of transcripts in the kidneys, mRNA was isolated from this tissue and analysed by RT-PCR using gene specific primers. Five fragments named MTX-1–MTX-5 could be amplified (Figure 1). Sequencing showed that fragment MTX-1 corresponds to the mRNA variant 3 that was previously obtained from the kidneys, while MTX-2 contained the same insert as the mRNA variant 2 known from liver. The unique insertion in MTX-2 allowed to obtain a new full length clone by RACE-PCR (AY756273, mRNA variant 4). This mRNA contained the same 5'-sequence as mRNA variant 3 from kidney, differing from that of all mRNAs from the liver. Sequencing of ten 5'-RACE fragments from liver and five from kidney further showed that the majority of transcripts (10/10 and 5/5) contain these divergent sequences. Such 5'-heterogeneity may be the result of tissue-specific promoter usage. Sequencing of the fragments MTX-3 and MTX-4 suggested that these were solely structural conformations of MTX-1 and MTX-2 with different electrophoretic mobility. Surprisingly, sequencing of MTX-5 revealed two variants that differed from MTX-1 by deletion of 116 and 119 bp, respectively.

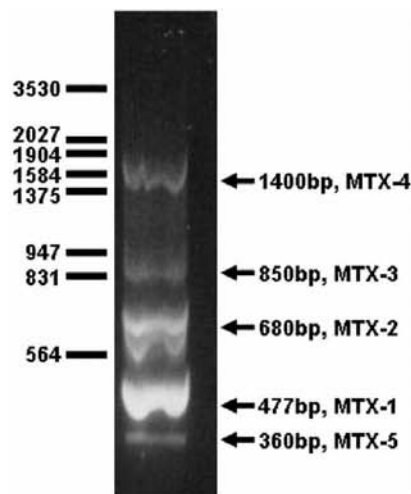


Figure 1. Detection of variants of *slc19a1* transcripts by RT-PCR with sequence specific primers. RNA was obtained from liver and kidney tissue of adult Sprague-Dawley (SD) rats using the RNeasy Mini system and poly(A)⁺ mRNA was isolated using the Oligotex messenger RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed on mRNA extracted from 1.2 µg total RNA using Omniscript RT (Qiagen) and 20 pmol (dT)₁₆ over 60 min at 37°C in a reaction volume of 20 µl. Alternative splicing products were amplified by PCR from 1 µl of the cDNA employing primers that flank the second half of the predicted ORF (746F: ggagccttgccctgtgag, 1222R: ggcaatgggcacaaggaact). Amplification by 1.25 U Taq polymerase (peqlab, Erlangen, Germany) was started with an initial denaturation step of 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C (30 s), 54°C (30 s) and 72°C (2 min), and a final extension step for 7 min at 72°C. The PCR products were analysed in 0.7 and 1.0% agarose gels and extracted (QIAquick, Qiagen) for cloning. In addition to the dominating fragment MTX-1 of 477 bp, corresponding to the main splicing form, products with apparent sizes of approximately 360, 680, 850 and 1400 bp were observed. All cloned fragments were sequenced on an ABI Prism automated sequencer.

Gene structure

Homology searches of the rat genome database revealed a locus on rat chromosome 20 containing all sequences of the full length MTX-cDNA clones and fragments thereof that were isolated from rat tissue so far (AABR01066371). An alignment suggested the existence of seven exons and six introns spanning approximately 18,000 nucleotides (Figure 2). The first two exons were designated exon Ia and I as these are apparently utilised alternatively. All splice donor and acceptor site sequences were in agreement with the consensus GT/AG with exception of the third intron (intron II). At the donor site of this intron, a C replaced the consensus T at position +2 (Table I). Identical observations were made for the corresponding third intron of the hamster (Murray et al. 1996), mouse (Tolner et al. 1997), and human (Williams and Flintoff 1998) *rhc* gene. In knowledge of

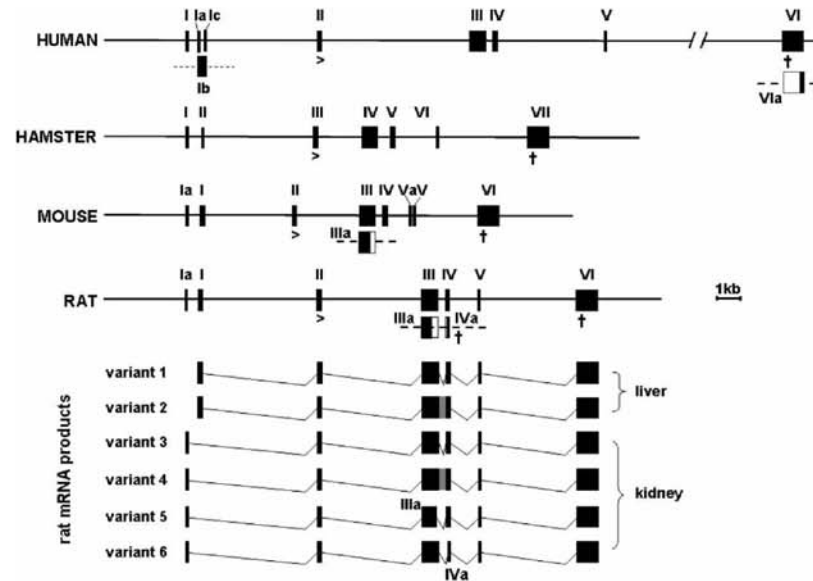


Figure 2. Comparative organisation of *slc19a1* gene in human, hamster, mouse, and rat and transcripts isolated from rat liver and kidney. Boxes indicate exons, > and † translational start and termination sites. Alternative or truncated exons are given on a dotted line below (data for human, hamster and mouse from (Murray et al. 1996, Tolner et al. 1997, Williams and Flintoff 1998)). Exon I and Ia of the rat gene were used alternatively in liver and kidney, respectively, yielding variants 1/2 and 3/4. Intron 3 was not spliced in the minor variants 2 and 4. Variants 5 and 6 resulted from a shortened exon III (exon IIIa) and exon IV (exon IVa), respectively. Length of exons and introns are shown in scale. Full length clones for variants 1–3 were obtained previously (Honscha et al. 2000, Kneuer et al. 2004), and variant 4 was cloned by RACE-PCR as follows: The 5'-end was amplified from reverse transcribed poly(A)⁺ mRNA using a forward primer binding near the initiation site for the alternative kidney transcripts (44F, acgggtggagtgatcattctttg) and a specific primer binding to the unique sequence inserted in fragment 2 (1393R, ggtaggagcatttgatcagcgctgagc). The 3'-sequence was obtained using a forward primer binding in the same inserted sequence (1264F, ccttgccctgggctagaccaccaatgta) and a reverse primer binding to the adapter sequence of the oligo(dT) employed for reverse transcription (AP, gctgtcaacgatacgtactgaacg and AP-nested, cgtactgaacggcatgacagtg). Variants 5 and 6 were constructed from the unique fragments obtained by RT-PCR. Exon/Intron identification: Using BLAST, we identified the rat *slc19a1* gene within the *rattus norvegicus* chromosome 20 whole genome sequence, WGS supercontig NC_005119. All exons of the gene were identified by alignment of the splicing variants cDNA sequences with the complement of a 29 kb region of NC_005119 using MegAlign 5.06 (DNASTAR Inc., Madison, USA) employing the Clustal W algorithm. For subsequent definition of the exon/intron sequences, the alignment was corrected to fit the GT–AG rule (exon–GT...(intron)...AG–exon).

this genetic organisation, the origin of mRNA variants 1–4 can now be explained and the two RT-PCR fragments MTX-5 suggest existence of mRNA variants 5 (AY756272) and 6 (AY756271) arising from alternative exons IIIa and IVa.

Comparison of the genetic structure of rat *slc19a1* with that of its homologues revealed substantial similarities as illustrated in Figure 2 (Murray et al. 1996, Tolner et al. 1997, Williams and Flintoff 1998). Heterogeneity in the 5'-region was observed in all

Table I. Genomic organisation of the rat *slc19a1* gene on chromosome 20.

Exon	Start	5'-sequence* intron–EXON	End	3'-sequence* EXON–intron	Size [nt]*	Features†
I	5441GATCCG	5487	GGACGG–gtaggg	47	
Ia	5984GCGACC	6193	TGCGAA–gtgagt	210	
II	10898	ctccag–GTGGAG	11127	GAGCAG–gcacgt	230	ATG
III	15470	gcgcag–GTGACC	16223	TTCTGA–gtatgc	754	
IIIa	15470	gcgcag–GTGACC	16107	CCTCTG–gtgggt	638	+2
IV	16427	ctccag–GCGCCA	16619	TGCCAC–gtgagt	193	
IVa	16546	ttccag–ATCCCG	16619	TGCCAC–gtgagt	74	+2
V	17842	tccag–TTTTCA	17983	CAACAG–gtaaa	142	
VI	22113	tccag–TTCCGC	23003	ACTACA–.....	891	Stop
Intron III	16224	gtatgc–	16426	–ctccag	203	Stop

* Exon length as determined by sequencing, except for exons I, Ia and VI, the length on which are based on the longest cDNA clones available.

† + 2 indicates a frame shift of two nucleotides.

4 C. Kneuer et al.

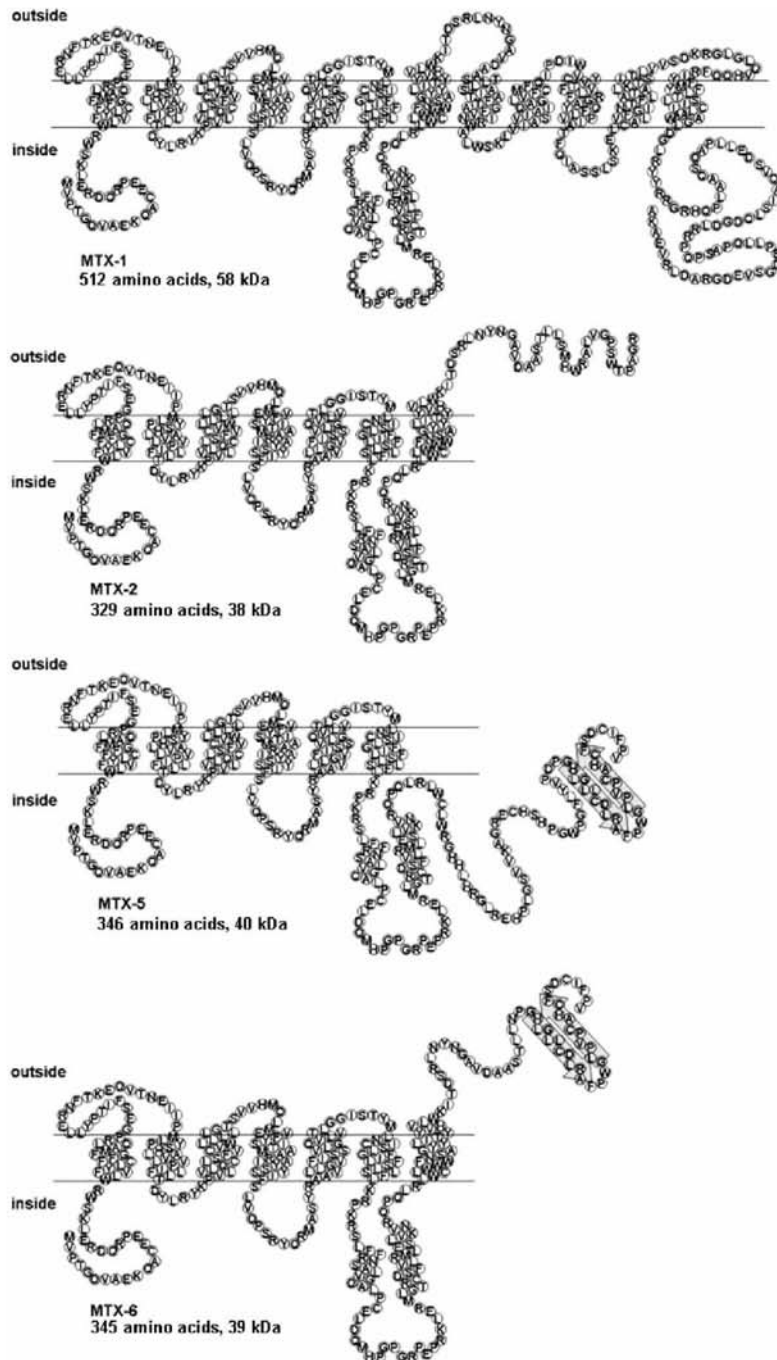


Figure 3. Prediction of the translation products for all rat *slc19a1* transcripts. Open reading frames of mRNA variants 1–6 were identified using Edit Sequence 5.06 (DNASTAR Inc., Madison, USA) and the longest ORF of each variant was translated into a putative translation product. Variants 1 and 3, as well as 2 and 4, will result in identical 58 and 38 kDa proteins termed MTX-1 and MTX-2, while the translation products of mRNA variants 5 and 6 are MTX-5 and MTX-6 with 40 and 39 kDa, respectively. Likely secondary structures including α -helices, β -sheets and flexible regions and transmembrane domains as well as the general topology were predicted using Protean 5.06 (DNASTAR Inc.), Tmpred available at http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html based on TMbase, and Toppred II (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) utilising the Heijne algorithm and the positive-inside rule or the Kyte-Doolittle method.

species: rat and mouse *slc19a1* possess two alternative first exons I and Ia, while the human gene contained at least four alternative first exons (I, Ia, Ib and Ic) with partial overlap. Interestingly, the hamster gene holds also two exons upstream of the first coding exon, but a transcriptional start from the second exon was not reported. Instead, two mRNA variants were identified that differed by splicing of the second exon only. The following exon containing the translational start codon was similar in all species. Interestingly, a similar truncated form of exon III (exon IIIa) that we reported here for rat *slc19a1* was also known from mouse. In contrast, the truncated version of exon IV (exon IVa) has not been previously reported in other species. An alternative exon Va has only been reported in mouse (Williams and Flintoff 1998). In all species, exon VI (exon VII in hamster) was well distanced and contained the translation termination site of the major mRNA variant. Significant usage of a cryptic splice acceptor site within exon VI causing loss of the first 987 nt was first observed in Mtx resistant human leukaemia cells but could be confirmed in parental cells (Drori et al. 2000).

Predicted peptide structures

To analyse the consequences of alternative exon usage and splicing on the primary protein structure in rat, open reading frame predictions were performed (Figure 3). These suggested a start codon at nt 48–50 of exon 2 shared by all transcripts. Alternative splicing, however, resulted in considerable variations in the C-terminal region of the putative product. mRNA variants 1 and 3 from liver and kidney, respectively, translate into a 58 kDa polypeptide of 512 amino acids termed MTX-1 without any N-terminal signal peptide sequences. Lack of splicing of intron 3, that gave rise to splicing variants 2 and 4, introduced 17 new codons including a premature stop. Consequently, the first 313 amino acids are identical between the putative translation products of mRNA variants 1/3 and 2/4, respectively. The later (MTX-2) has a predicted size of 329 amino acids and 38 kDa. A similar situation applied to variants 5 and 6. Here, usage of alternative splice donor or acceptor sites in exons 3 and 4 induce a frame shift. The resulting translation products will be identical with MTX-1 and MTX-2 from amino acids 1 to 273 and 312, respectively, which are followed by 72 or 34 additional residues, before translation is terminated prematurely within exon 4. The predicted molecular mass of MTX-5 and 6 is 40 and 39 kDa (346 and 345 aa).

The amino acid sequence of all putative translation products of the reduced folate carrier was further analysed with regard to their likely organisation within the membrane. The 58 kDa protein MTX-1 was predicted to contain 12 transmembrane domains (TMDs) with both termini localised within

the cytoplasm (Figure 3). An identical topology has been previously suggested for the human homologue (Liu and Matherly 2002, Cao and Matherly 2004). One of the TMDs was missed by the knowledge based TM-Pred routine, but not by the methods based on van Heijne and Kyte-Doolittle hydrophobicity plots. The translation products termed MTX-2 and MTX-6 retain only the first seven of these TMDs and present the N-terminus to the extracellular lumen, while MTX-5 will have six membrane spanning units. However, all four proteins would share the major intracellular loop following TM6 which contains two stretches that may assume an α -helical organisation separated by a proline-rich region. MTX-5 and 6 further contain a distinct C-terminal sequence that is predicted to assume a β -sheet structure. Whether or not these *Slc19a1* variants would be presented at the cell surface and of biological significance remains at present a matter of speculation, although Drori et al. have previously reported overexpression of an otherwise minor splicing variant in human leukaemia cells (Drori et al. 2000). The truncated protein showed no substrate binding but substantially augmented the activity of the co-expressed native form.

References

- Cao W, Matherly LH. 2004. Analysis of the membrane topology for transmembrane domains 7–12 of the human reduced folate carrier by scanning cysteine accessibility methods. *Biochem J* 378:201–206.
- Dixon KH, Lanpher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. 1994. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem* 269:17–20.
- Drori S, Sprecher H, Shemer G, Jansen G, Goldman ID, Assaraf YG. 2000. Characterization of a human alternatively spliced truncated reduced folate carrier increasing folate accumulation in parental leukemia cells. *Eur J Biochem* 267:690–702.
- Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. 2004. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 447:641–646.
- Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. 1968. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem* 243:5007–5017.
- Gorlick R, Goker E, Trippett T, Steinhert P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, Flintoff WF, Bertino JR. 1997. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood* 89:1013–1018.
- Honscha W, Dötsch KU, Thomsen N, Petzinger E. 2000. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology* 31:1296–1304.
- Kneuer C, Honscha W. 2004. The H⁺-dependent reduced folate carrier 1 (RFC1) of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 (MTX-1) of the rat are orthologs. *FEBS Lett* 566:83–86.
- Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. 2004. Sodium-dependent methotrexate carrier-1 is expressed in rat kidney: Cloning and functional characterization. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F564–F571.

- Liu XY, Matherly LH. 2002. Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1564:333–342.
- Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon KH, Anzick SL, Meltzer PS, Cowan KH. 1995. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* 55:3790–3794.
- Murray RC, Williams FM, Flintoff WF. 1996. Structural organization of the reduced folate carrier gene in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271:19174–19179.
- Roy K, Chiao JH, Spengler BA, Tolner B, Yang CH, Biedler JL, Sirotinak FM. 1998. Chromosomal localization of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter and its amplification in an antifolate resistant variant overproducing the transporter. *Cancer Genet Cytogenet* 105:29–38.
- Tolner B, Roy K, Sirotinak FM. 1997. Organization, structure and alternate splicing of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter. *Gene* 189:1–7.
- Tolner B, Roy K, Sirotinak FM. 1998. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene* 211:331–341.
- Tolner B, Singh A, Esaki T, Roy K, Sirotinak FM. 1999. Transcription of the mouse RFC-1 gene encoding a folate transporter. Multiplicity and properties of promoters with minimum requirements for their basal activity. *Gene* 231:163–172.
- Williams FM, Flintoff WF. 1998. Structural organization of the human reduced folate carrier gene: Evidence for 5' heterogeneity in lymphoblast mRNA. *Somat Cell Mol Genet* 24:143–156.
- Williams FM, Murray RC, Underhill TM, Flintoff WF. 1994. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem* 269:5810–5816.
- Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. 1995. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270:17468–17475.

ADDENDUM

Alternative transcripts of rat *slc19a1*: Defective sorting and inefficient expression of alternative splicing products—an addendum*

STEPHANIE SCHRADER¹, CARSTEN KNEUER¹, HAMID M. SAID², & WALTHER HONSCHA¹

¹*Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, An den Tierkliniken 15, University of Leipzig, Leipzig 04103, Germany, and* ²*School of Medicine and the VA Medical Center, University of California, Long Beach, CA 90822, USA*

(Received 31 October 2005)

Abstract

Recently, we have reported about the existence and cloning of alternative transcripts of the solute carrier 19a1 in rat liver and kidney, and have explained their origin from tissue specific promoters and by alternative splicing [DNA Seq. 2005, 16(1), 1–6]. The variant open reading frames (ORFs) of these transcripts were now expressed as fusion proteins with an *N*-terminal GFP. Transfection of HPCT-1E3 hepatocytoma cells as well as the MDCK kidney epithelial cell line with the GFP-fusion of the major splicing form containing 12 transmembrane domains (TMD) resulted in a strong fluorescence at the plasma membrane, which was stable over at least 3 days. Expression of GFP alone gave a comparable overall fluorescence intensity, although, staining was distributed evenly throughout the cells. Fusions of GFP with the shorter ORFs of all alternative *slc19a1* transcripts containing 6–7 predicted TMD were expressed less efficiently and not sorted to the plasma membrane. Instead, these proteins accumulated in intracellular granules, and were, apparently, degraded. Hence, it is unlikely that these minor splicing forms are directly involved in solute transport across the plasma membrane.

Keywords: *Methotrexate carrier, reduced folate carrier, rfc, Rfc1, slc19a1, splicing variants*

Introduction

The reduced folate carrier (Rfc1) represents the major route of cellular uptake for reduced folates such as tetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate and antifolate drugs like methotrexate (Goldman et al. 1968; Gorlick et al. 1997). This carrier has been classified as member 1 of the solute carrier family 19, subfamily A (Slc19a1) (Ganapathy et al. 2004). Corresponding cDNAs were cloned from human (Moscow et al. 1995; Wong et al. 1995) mouse (Dixon et al. 1994), hamster (Williams et al. 1994) and rat tissues (Honscha et al. 2000). As the later cDNA was first characterised as a carrier that mediates bile acid sensitive sodium-dependent methotrexate uptake, it is also called methotrexate

carrier-1 (MTX1) and represents the rat ortholog to human, mouse and hamster Rfc1 (Kneuer and Honscha 2004).

Very recently, we have reported about the genomic organization of rat *slc19a1*, the existence of alternative splicing products to the main transcript and the use of tissue specific promoters (Kneuer et al. 2005). These six transcripts encoded four different open reading frames (ORFs) corresponding to the putative polypeptides MTX1, MTX2, MTX5 and MTX6. MTX1/Rfc1 is known to be functionally active, and contains 12 transmembrane domains (TMD) with both termini located intracellular (Liu and Matherly 2002; Cao and Matherly 2004). MTX2, 5 and 6 share identical

Correspondence: W. Honscha, Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, An den Tierkliniken 15, University of Leipzig, Leipzig 04103, Germany. Tel: 49 341/9738132. Fax: 49 341/9738149. E-mail: honscha@vetmed.uni-leipzig.de

*Kneuer C, Schrader S, Honscha W (2005) Alternative transcripts of rat *slc19a1*: Cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing. DNA Seq 16(1), 1–6.

amino acids with MTX1 up to position 313, 273 and 312, respectively (Kneuer et al. 2005). This common sequence contains the first 6 TMDs, the major intracellular loop between TMD 6 and 7, and, with exception of MTX5, TMD 7. Alternative splicing resulted in premature termination of translation in all cases, with no further predicted transmembrane segments in MTX2, 5 and 6 (Kneuer et al. 2005). Results by Marchant et al. however, gave reasons to doubt, that such shortened variants are efficiently expressed and translocated to the plasma membrane (Marchant et al. 2002). In that study, all GFP-fusion constructs containing the amino acids 1–301 of human Rfc1 (corresponding to aa 1–297 of rat MTX1) were not targeted to the cell membrane.

Results and discussion

The complete ORFs of MTX1, 2, 5 and 6 were cloned into the GFP expression vector pEGFP-C2 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) using standard techniques. In frame insertion and identity was confirmed by sequencing of the entire inserted sequence. Plasmid DNA for transfection of cell cultures was obtained using the QIAGEN Plasmid Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For transfection, HPCT-1E3 hepatocytoma and MDCK canine kidney epithelial cells were seeded on sterile cover slips placed in 24-well plates at a density of 90,000 and 60,000 cells/cm². On day 2, a transfection cocktail containing 1 µg of plasmid DNA and 3.2 µl nanofectin I reagent (PAA, Linz, Austria) in 200 µl of serum-free DMEM was added per well. Four hours later, the supernatant was replaced by fresh culture medium. Transfected cultures were fixed with 2% paraformaldehyde after 24, 48 and 72 h, mounted and evaluated by fluorescence microscopy. Representative images after 24 and 48 h incubation are shown in Figure 1. Images obtained after 72 h were omitted, as there were no major differences from the 48 h observation.

Transfection of both cell lines with the empty pEGFP-C2 vector resulted in a strong and evenly distributed staining of approximately 80% of cells. As expected from earlier studies, the fusion construct of GFP and the ORF of the main splicing form of *slc19a1*, GFP-MTX1, was also strongly expressed with comparable efficiency. A targeting of the fluorescence signal to the cell membrane was readily apparent after 48 h in both cell lines. In contrast, all GFP fusions of the ORFs of the minor splicing forms, were expressed less efficiently (GFP-MTX2: ~40%, GFP-MTX5, 6: ~50%). Major differences were also observed in the subcellular localisation of the expressed proteins. One day after

transfection of HPCT-1E3 cells, GFP-MTX2, 5 and 6 were evenly distributed throughout the cytoplasm, while a sorting of GFP-MTX1 to the cell membrane was partially visible. At day 2, fluorescence of GFP-MTX2, 5 and 6 clustered in unidentified structures around the nuclei. When MDCK cells were used, this clustering was observed already at day 1 and continued on day 2 and 3. Sorting of GFP-MTX1 to the cell membrane was also accelerated in MDCK cells in comparison to HPCT-1E3 cells.

In order to clarify whether the observed loss of GFP-MTX2, 5 and 6 was due to mRNA instability or an unfavourable ratio of translation to protein degradation, Cos-1 and MDCK cells without endogenous rat *slc19a1* expression were stably transfected and evaluated for mRNA levels. Selection over 2 weeks using G418 at a concentration of 400 µg/ml resulted in comparable numbers of resistant clones with all plasmids (pEGFP-C2, pGFP-MTX1-6). As expected, GFP and GFP-MTX1 transfected clones showed a fluorescence comparable to that observed after transient transfection. However, no fluorescence was detectable in any of the G418-resistant clones obtained with pEGFP-MTX2, 5 and 6. In these cases, fluorescence ceased from the levels described above to zero within approximately 4 days. A selection of G418-resistant clones was subjected to RT-PCR analysis for presence of the corresponding mRNA. Interestingly, the majority of these clones contained high levels of GFP-MTX2, 5 and 6 mRNA, but did not possess any detectable fluorescence, suggesting either down-regulation of mRNA translation or rapid degradation of the translation products.

These results and previous findings suggest that the reported alternative splicing products of rat *slc19a1* are of limited significance, if any, in transport function of the folate compounds. This conclusion is based on the following observations: (i) the mRNA level of these transcripts is significantly lower than that of MTX1 (i.e. Rfc1) (Kneuer et al. 2005); (ii) the corresponding GFP-fusion proteins were not translocated to the cell membrane when expressed in *in vitro* models of the hepatocyte and the renal epithelium and; (iii) the expression of these GFP-fusion proteins was unstable. The conclusion is further supported by previous confocal imaging studies with human Rfc1 fused to GFP in living mammalian epithelial cells which have shown that a construct of similar size to MTX2, 5 and 6 was (iv) translated very inefficiently in these cells (translation efficiency was approximately 27.4 ± 3% compared to that of the full length hRfc1) and (v) even the translated fraction of these transcripts did not appear to traffic to the cell membrane but remained trapped intracellularly (Marchant et al. 2002).

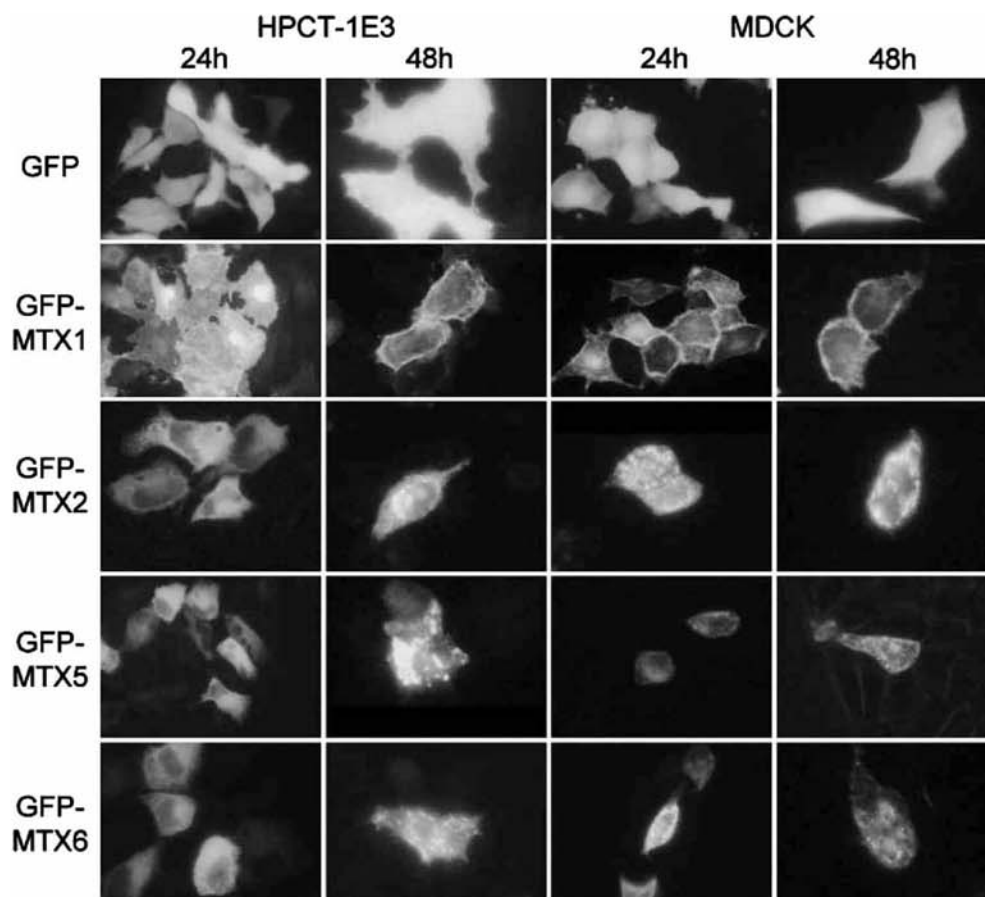


Figure 1. Expression and targeting of *slc19a1* transcript—GFP fusions in HPCT-1E3 hepatocytoma and MDCK kidney epithelial cells. HPCT-1E3 and MDCK cells were seeded on glass cover slips and transfected with the empty pEGFP-C2 vector, the expression vector pEGFP-MTX1 encoding the ORF of the main *slc19a1* transcript fused to GFP, as well as pEGFP-MTX2, pEGFP-MTX5 and pEGFP-MTX6 containing the ORF of the respective alternative transcript. Cells were fixed 24 or 48 h post transfection and evaluated by fluorescence microscopy. Representative images are shown. The images obtained after 48 h are enlarged 1.5-fold.

Acknowledgements

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HO2103/1-2).

References

- Cao W, Matherly LH. 2004. Analysis of the membrane topology for transmembrane domains 7–12 of the human reduced folate carrier by scanning cysteine accessibility methods. *Biochem J* 378:201–206.
- Dixon KH, Lanpher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. 1994. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem* 269:17–20.
- Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. 2004. SLC19: The folate/thiamine transporter family. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 447:641–646.
- Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. 1968. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem* 243:5007–5017.
- Gorlick R, Goker E, Trippett T, Steinherz P, Elisseyeff Y, Mazumdar M, Flintoff WF, Bertino JR. 1997. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood* 89:1013–1018.
- Honscha W, Dötsch KU, Thomsen N, Petzinger E. 2000. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology* 31:1296–1304.
- Kneuer C, Honscha W. 2004. The H⁺-dependent reduced folate carrier 1 (RFC1) of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 (MTX-1) of the rat are orthologs. *FEBS Lett* 566:83–86.
- Kneuer C, Schrader S, Honscha W. 2005. Alternative transcripts of rat *slc19a1*: Cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing. *DNA Seq* 16(1):1–6.
- Liu XY, Matherly LH. 2002. Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1564:333–342.

86 S. Schrader *et al.*

- Marchant JS, Subramanian VS, Parker I, Said HM. 2002. Intracellular trafficking and membrane targeting mechanisms of the human reduced folate carrier in mammalian epithelial cells. *J Biol Chem* 277:33325–33333.
- Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon KH, Anzick SL, Meltzer PS, Cowan KH. 1995. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* 55:3790–3794.
- Williams FM, Murray RC, Underhill TM, Flintoff WF. 1994. Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem* 269: 5810–5816.
- Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. 1995. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270:17468–17475.

10 DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde am Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig angefertigt. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walther Honscha für die Bereitstellung des interessanten Themas und die engagierte wissenschaftliche Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Carsten Kneuer bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und der Korrektur des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Frau Dr. Sandra Halwachs, Herrn PD Dr. Getu Abraham und Frau Cathleen Lakoma für die guten wissenschaftlichen und privaten Gespräche.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Rudi und Margrit Schrader, die während der gesamten Zeit mit Interesse das Fortkommen dieser Arbeit verfolgt und mich in jeglicher Form unterstützt haben. Herzlichen Dank Herrn Dr. Arndt Wießner für den Beistand und die anregenden Gespräche.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Wilhelm-Schaumann-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.